

INDUKTION ATMUNGSDEFEKTER MUTANTEN
VON SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE DURCH
ZERFALL VON EINGEBAUTEM ^{32}P
IHRE SELEKTION UND ANALYSE

Annelies I. Furtmayr-Schuh

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Genetischen Institut der Universität München
Lehrstuhlinhaber Prof. Dr. F. Kaudewitz

INDUKTION ATMUNGSDEFEKTER MUTANTEN VON
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE DURCH ZERFALL VON EINGEBAUTEM ³²P
IHRE SELEKTION UND ANALYSE



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
ANNELIES I. FURTMAYR-SCHUH aus Daubitz

München 1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K. Moritz

Tag der mündlichen Prüfung: 2. VI. 1976

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1971 bis Dezember 1974 am Genetischen Institut der Universität München durchgeführt. Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz danke ich für das Thema und die Betreuung der Arbeit.

DEM ANDENKEN MEINES VATERS

GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

A.) EINLEITUNG

I.) Mitochondrien, semiautonome Zellorganelle	1
II.) Problemstellung der vorliegenden Arbeit	2

B.) MATERIAL UND METHODEN

I.) Stämme	4
II.) Medien	4
III.) Feinchemikalien	5
IV.) Methoden	6
IV. 1.) Einbau von ^{32}P in <u>Sch. pombe</u>	6
IV. 2.) Einbau von radioaktivem Leucin und Adenin in <u>Sch. pombe</u>	7
IV. 3.) Bestimmen der eingebauten Radioaktivität	7
IV. 4.) Proteinbestimmung	8
IV. 5.) Genetische Methoden	8
IV. 6.) Auxotrophietest	9
IV. 7.) Prüfen der Atmungsdefizienz	9
IV. 8.) Statistische Methoden	10

C.) ERGEBNISSE

I.) Die Wirkung von Cycloheximid auf <u>Sch. pombe</u>	11
I. 1.) Der Einfluß von CHX auf die Zellver- mehrung von <u>Sch. pombe</u>	11
I. 2.) Einbau radioaktiv markierten Leucins in die Zellproteine von <u>Sch. pombe</u>	12
I. 3.) Einbau radioaktiv markierten Adenins in die DNS-Fraktion von <u>Sch. pombe</u> in Gegenwart von CHX	12

I. 4.) Reversible Hemmwirkung von CHX	13
II.) Sistieren des Zellstoffwechsels durch tiefe Temperaturen	14
II. 1.) Biophysikalische Grundlagen des Einfrier- und Auftauprozesses	14
II. 2.) Einfluß verschiedener Gefrierverfahren auf die Befähigung zur Koloniebildung bei <u>Sch. pombe</u>	16
III.) Radioaktiver Zerfall und Mutagenese	18
III. 1.) Einfluß des radioaktiven Zerfalls von ^{32}P auf die Befähigung zur Koloniebildung von <u>Sch. pombe</u>	18
III. 2.) Anreicherung und Selektion der mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten	19
III. 3.) Mutagene Wirkung des Zerfalls von in die mit DNS inkorporiertem ^{32}P	25
III. 4.) Beeinflussung der Ergebnisse durch Versuchsparameter	27
IV.) Charakterisierung der mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten	29
IV. 1.) Verhalten in der Kultur	29
IV. 2.) Verhalten der RD-Mutanten bei verschiedenen Glucosekonzentrationen im Medium	30
IV. 3.) Erstmaliges Auftreten von RC-Zellen in wachsenden RD-Kulturen	31

IV. 4.) Vererbung des mit ^{32}P induzierten Atmungsdefektes	32
--	----

D.) DISKUSSION

I.) Einfluß von Cycloheximid (CHX) auf die Protein- und DNS-Synthese	35
II.) Mutagene Wirkung des inkorporierten radioaktiven Phosphors (^{32}P)	35
III.) Vererbungsmodus des mit ^{32}P unter dem Einfluß von CHX induzierten Atmungs- defektes bei <u>Sch. pombe</u>	38
IV.) Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit innerhalb von Kulturen atmungsdefekter Mutanten	41
V.) Mögliche Ursachen für das Wiedererlangen der Atmungsfähigkeit	42

E.) ZUSAMMENFASSUNG

F.) LITERATURVERZEICHNIS

G.) ABBILDUNGEN UND TABELLEN

A.) EINLEITUNG

I.) Mitochondrien, semiautonome Zellorganelle

Die Enzyme der Atmungskette befinden sich bei eukaryotischen Zellen in den Mitochondrien. Für die Ausbildung der vollständigen Atmungsfunktion benötigt die Zelle genetische Informationen, die teilweise im Zellkern und in den Mitochondrien selbst codiert sind (EPHRUSSI 1953; SHERMAN 1963; SHERMAN und SLONIMSKI 1964; WILKIE 1968; FUKUHARA 1969). Die Mitochondrien besitzen wie Zentriole, Kinetoplasten und Chloroplasten organelleigene DNS. Neben der Informationsspeicherung in Form der DNS-Moleküle ist auch das Vorhandensein eines vollständigen Systems der Informationsrealisierung innerhalb der Mitochondrien nachgewiesen. In ihnen wird transkribiert und es werden Proteine synthetisiert (WINTERSBERGER und TUPPY 1965; WINTERSBERGER und VIEHAUSER 1968; FUKUHARA 1967). Daran wird erkennbar, daß die Mitochondrien semiautonome Organelle bezüglich ihrer funktionellen Leistung sind. Mutanten, die Defekte in der mitochondrialen DNS (mitDNS) tragen, sind somit geeignete Studienobjekte, um die Wechselbeziehungen zwischen dem Kerngenom und dem mitochondrialen Genom zu untersuchen. Hier stehen an erster Stelle die atmungsdefekten Mutanten. Im Gegensatz zum atmungskompetenten Wildtyp RC (respiratory competent) werden sie als RD (respiratory deficient) bezeichnet.

Bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae sind zwei genetisch verschiedene Typen der Atmungsdefizienz bekannt (EPHRUSSI 1953), die karyotischen RD-Mutanten und der bei diesem Organismus sehr häufig auffindbare RD-Mutantentyp, dessen genetischer Defekt extrakaryotisch, in den Mitochondrien, lokalisiert ist. Die extrakaryotischen RD-Mutanten der Hefe S. cer. zeigen einen gemeinsamen Phänotyp. Mit dem Verlust der Atmungskapazität gingen bei allen diesen bisher beschriebenen

RD-Mutanten die Enzymaktivitäten aller Atmungsenzyme mehr oder weniger verloren. Somit lassen sich mit diesen Mutanten keine Untersuchungen über die Codierung bestimmter Atmungskettenenzyme oder Enzymuntereinheiten anstellen. Auch für biochemische Studien einzelner Funktionseinheiten der Atmungskette sind diese Mutanten ungeeignet. Zur Aufklärung der Wechselbeziehungen zwischen dem Kerngenom und dem Genom der Mitochondrien muß deshalb ein Organismus herangezogen werden, bei dem der mitochondriale genetische Defekt punktförmige Ausfälle der Enzymausstattung bedingt, so wie es die karyotischen Mutanten zeigen.

Bei der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe sind eine Vielzahl karyotischer RD-Mutanten bekannt (HESLOT et al. 1970; WOLF et al. 1970; GOFFEAU et al. 1972). Extrakaryotische RD-Mutanten sind bei Sch. pombe bisher noch nicht isoliert worden. Selbst der Einsatz von Mutagenen wie Ethidiumbromid und Acridinen, die bei S. cer. ausschließlich und in hohem Maße extrakaryotische RD-Mutanten induzieren, blieb erfolglos (HESLOT et al. 1970; SCHWAB et al. 1971).

II.) Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Bei Sch. pombe sollten mit radioaktivem Phosphor (^{32}P), einem Mutagen, das in der Bakteriengenetik erfolgreich verwendet wurde (KAUDEWITZ et al. 1958), mitochondriale RD-Mutanten induziert werden. Für die Induktion mitochondrialer Mutationen war es notwendig, Bedingungen zu finden, die es ermöglichten, den radioaktiven Zerfall von ^{32}P ausschließlich oder wenigstens zum überwiegenden Teil in der mitdNS stattfinden zu lassen. Sie sollten Teil eines Verfahrens sein, schonend und gut dosierbar

Mutationsinduktion mit ^{32}P in Sch. pombe-Mitochondrien vorzunehmen. Weiterhin war ein Selektionssystem für die mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten zu entwickeln. Die so erhaltenen Ergebnisse schließlich machten Versuche möglich, welche der Frage galten, warum der extrakaryotische RD-Mutantentyp bei Sch. pombe bisher noch nicht isoliert werden konnte.

B.) MATERIAL UND METHODEN

I.) Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden auxotrophen Mutanten von Sch. pombe verwendet:

50 h⁻ ade7, 32 h⁻ leu1, 32 h⁺ leu1, 88 h⁺ his2 und 623 h⁺ ade6.

Diese Mutanten wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Wolf vom Genetischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt.

II.) Medien

EMM-B-Glycerin-Medium

Ein nach BIRNBOIM (1971) abgewandeltes Edinburgh Minimalmedium, das den Versuchsbedingungen angepaßt wurde. Die Phosphatkonzentration wurde beim Einbauversuch mit ³²P auf 13 mg/Liter reduziert. Vitamine und Spurenelemente entsprechen dem Edinburgh Minimalmedium (EMM) No. 2 (MITCHISON 1970).

NH ₄ Cl	1,0	g/Liter
KH ₂ PO ₄	2,0	"
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	"
Asparagin	0,1	"
Na-Acetat	2,5	"
L-Cystein-Hydrochlorid	0,02	"
Adenin	0,1	"
Caseinhydrolysat	10,0	"

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 4,5 eingestellt. Als Kohlenstoffquelle diente 3 % Glycerin.

YEP-Glucose bzw. YEP-Glycerin-Medium

Hefeextrakt 10g, Pepton aus Casein 5g, Glucose bzw. Glycerin 30g sowie Aqua dest. ad 1 Liter.

YEP-TTC-Medium

YEP-Glucose mit 50 mg TTC/Liter. Das TTC wurde filtersteril dem Medium bei 50° C zugegeben. Dieses Medium ist stets mit größter Sorgfalt unter standardisierten Bedingungen hergestellt und unter Lichtabschluß gehalten worden.

Kreuzungsmedium

Malzextrakt Diamalt AG, München 30 g und Aqua dest. ad 1 Liter.

Minimalmedium für Auxotrophietest

Yeast-Nitrogen-Base (Difco)	6,7	g
Glucose	30,0	"
L-Asparagin	0,2	"
KH ₂ PO ₄	5,0	"
Cystein	0,02	"
Aqua dest. ad	1	Liter

Supplementiertes Minimalmedium enthielt je nach vorliegender Auxotrophie entsprechende Wuchsstoffe, jeweils 0,1 mg/Liter.

Inkubationsmedium für Markierungsexperimente (IKM)

EMM-B-Glycerin-Medium ohne Caseinhydrolysat, Supplementierungen wurden nach Bedarf zugegeben, jeweils 0,1 mg/Liter.

Alle Festmedien enthielten zusätzlich 2 % Agar.

III.) Feinchemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Cycloheximid lieferte Serva GmbH, Heidelberg, Yeast-Nitrogen-Base Firma Difco, Detroit, Scintillatoren

die Packard GmbH, Frankfurt, und alle radioaktiv markierten Substanzen stammen von der Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig.

IV.) Methoden

1.) Einbau von ^{32}P in *Sch. pombe*

Zellen von *Sch. pombe* wurden in EMM-B-Glycerin-Medium pH 4,5 unter Belüftung bei 30°C inkubiert. Bei einem Zelltitert von etwa $1 \times 10^8/\text{ml}$ wurden die Zellen bei 30°C abzentrifugiert und, um den überschüssigen Phosphor zu entfernen, zweimal mit auf 30°C vorgewärmtem EMM-B-Glycerin-Medium ohne Phosphor gewaschen. Die Zellen wurden in vorgewärmtem EMM-B-Glycerin-Medium ohne Phosphat aufgenommen und 30 Minuten unter Belüftung im Ultrathermostat bei 30°C inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubation kamen CHX in steriler Lösung (0,2 mg/ml) und nach 15 Minuten Vorinkubation mit CHX radioaktives Phosphat mit 0,1 mM Trägerphosphat dazu. Das entspricht einer spezifischen Radioaktivität von rund 4 mCi/mg Phosphor. Fünf Stunden erfolgte Inkubation der Zellen im Ultrathermostat bei 30°C unter Belüftung.

Durch Abzentrifugieren der Zellen bei $+4^{\circ}\text{C}$ und zweimaligem Waschen mit $+4^{\circ}\text{C}$ kaltem Acetatpuffer 0,2 M wurde der Einbau abgebrochen, die Zellen in YEP-Glucose-Medium mit 20 % Glycerin suspendiert und in aliquote Portionen zu 0,1 ml auf kleine Gläschen verteilt (Zelltitert betrug $5 - 10 \times 10^7/\text{ml}$). Die locker verschlossenen Gläschen wurden zwei Stunden im Kühlraum bei $+4^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt, danach 15 Minuten in Stickstoffdampf gehängt und schließlich in den flüssigen Stickstoff eingetaucht und darin aufbewahrt.

2.) Einbau von radioaktivem Leucin und Adenin in Sch. pombe

Zellen von Sch. pombe wurden in YEP-Glycerin-Medium pH 4,5 unter Belüftung bei 30° C inkubiert. Bei einem Titer von etwa 5×10^7 Zellen pro ml wurden die Zellen bei 30° C abzentrifugiert, mit auf 30° C vorgewärmtem IKM pH 4,5 gewaschen, darin zu einem Titer von rund 5×10^8 /ml aufgenommen und im Ultrathermostaten unter Belüftung bei 30° C inkubiert. CHX und die radioaktiv markierten Substanzen kamen als filtersterile Lösungen dazu: ^3H -Adenin 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ und ^3H -Leucin 1,25 $\mu\text{Ci/ml}$. Die spezifische Radioaktivität betrug jeweils 250 mCi/mM. Durch Zugabe der hundertfachen Menge unmarkierten Substrates wurde die Pulsmarkierung beendet, die Zellen abzentrifugiert und ihre inkorporierte Radioaktivität gemessen.

3.) Bestimmen der eingebauten Radioaktivität

Abzentrifugierte Zellen wurden in MTE-Puffer aufgenommen, in einem Merckenschlager-Homogenisator (Braun, Melsungen) aufgeschlagen und die Zellproteine mit 8%-iger Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (MICHEL et al. 1971). Jeweils 1,5 ml wurden abzentrifugiert, mehrmals mit 6%-iger TCA gewaschen und anschließend 10 Minuten auf 90° C - 95° C erhitzt, die abgekühlten Proben mit einer Mischung aus Äthanol und Äther (3 : 1) und zuletzt mit reinem Äther gewaschen, an der Luft getrocknet und mit 0,5 ml Soluene überschichtet. Nachdem sich die Proteine gelöst hatten, nach etwa 24 - 36 Stunden, wurde mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit aufgefüllt (Toluol + PPO + POPO) und im Scintillationszähler (Packard Modell 3003) die Radioaktivität gemessen.

Zur Bestimmung der von den ganzen Zellen aufgenommenen Menge radioaktiven Leucins wurden aliquote Proben, etwa 1×10^9 Zellen/ml, nach der Inkubation 20

Minuten in 6%-iger TCA gekocht, abzentrifugiert, dreimal mit Wasser gewaschen, der noch feuchte Niederschlag in 5 ml Instagel aufgenommen und im Scintillationszähler gemessen.

Die in die DNS inkorporierte Menge radioaktiven Adenins wurde nach der Methode von HARTWELL (1967) bestimmt.

4.) Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al. (1951) im Photometer PMQ der Firma Zeiss.

5.) Genetische Methoden

a.) Freisporanalyse (LEUPOLD 1957, 1970)

Mutanten und Kreuzungspartner wurden in YEP-Glucose-Flüssigkulturen kultiviert, aus dem exponentiellen Wachstumsbereich aliquote Mengen entnommen und je zwei Partner auf ein Schrägröhrchen mit Kreuzungsmedium ausgestrichen. Nach siebentägiger Inkubation bei 25° C sind die gebildeten Asci bereits zerfallen und die Sporen liegen frei. Die Sporen und die noch vorhandenen vegetativen Zellen wurden mit 3,5 ml Wasser aufgeschwemmt, dieser Suspension absoluter Alkohol (1,5 ml) zugesetzt und das Gemisch 30 Minuten im Ultrathermostaten bei 18° C inkubiert. Die vegetativen Zellen wurden hierbei selektiv abgetötet und nach Zentrifugieren konnten die Sporen in Wasser aufgenommen und auf YEP-Glucose-Medium ausplattiert werden.

b.) Tetradenanalyse

Die Ernte der vollständigen Asci erfolgte nach dreitägiger Inkubation bei 25° C. Sie wurden in etwas Wasser aufgenommen und auf eine YEP-Glucose-Platte

in Form eines dicken Striches seitlich ausgestrichen. Die so vorbereiteten Platten wurden noch einige Stunden oder über Nacht bei 25⁰ C inkubiert. Dabei zerfällt der größte Teil der Asci, die vier Sporen liegen jedoch noch beieinander und können mit dem Mikromanipulator auf der Platte getrennt ausgelegt werden. Danach wurden die Platten 3 - 4 Tage bei 30⁰ C inkubiert und anschließend die Sporenkolonien auf den entsprechenden Selektionsmedien geprüft.

c.) Prüfen der Heterothallie

Im Gegensatz zum h^- Paarungstyp mutiert Sch. pombe mit dem h^+ Paarungstyp häufig zum homothallischen Typ h^{90} (LEUPOLD 1958). Homothallische Zellen vermögen untereinander zu kopulieren und bilden Asci. Auf Kreuzungsmedium ausplattiert, lassen sich die Asci mit Joddampf nachweisen und von den heterothallischen Zellen unterscheiden.

6.) Auxotrophietest

Die auf einer YEP-Glucose-Mutterplatte gewachsenen Kolonien wurden mittels eines Samtstempels auf Minimalmedium und Minimalmedium mit entsprechender Supplementierung übertragen. Danach wurde nochmals auf YEP-Glucose-Medium zur Kontrolle abgestempelt.

7.) Prüfen der Atmungsdefizienz

a.) Abstempeln der auf YEP-Glucose wachsenden Kolonien auf YEP-Glycerin. Die Kolonien auf YEP-Glucose, deren Stempelabdrücke auf YEP-Glycerin nicht anwachsen, werden RD bezeichnet, andere nichtvergärbare Substrate sind für Sch. pombe ungeeignet (MITCHISON 1970).

b.) Zur quantitativen Kontrolle von RD-Kulturen

wurde die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen auf YEP-Glucose bestimmt und parallel dazu, durch Plattieren verschiedener Verdünnungsstufen auf YEP-Glycerin-Medium, der Anteil an RC-Zellen unter den vermehrungsfähigen Zellen ermittelt.

8.) Statistische Methoden

Berechnung der Konfidenzbereiche nach KOLLER (1969) und CAVALLI-SFORZA (1972).

C.) ERGEBNISSE

I.) Die Wirkung von Cycloheximid auf Sch. pombe

GROSSMAN et al. (1969) gelang es mit dem Antibiotikum Cycloheximid (CHX) in Zellen von S. cer. die Kern-DNS-Synthese relativ zur mitDNS-Synthese zu hemmen. Werden Zellen von S. cer. 5 bis 6 Stunden mit CHX und ^3H -Adenin inkubiert, so finden sich 90 % der radioaktiven Markierung, der im CSCI-Dichtegradienten isolierten Zell-DNS, in der mitochondrialen Region. Sollte sich eine solche Wirkung des Antibiotikums auch für Sch. pombe feststellen lassen, so wäre es möglich, die Kern-DNS-Synthese zu unterdrücken und bei weiter laufender mitDNS-Synthese ^{32}P in die mitDNS selektiv einzubauen.

I. 1.) Der Einfluß von CHX auf die Zellvermehrung von Sch. pombe

Um die Sensibilität von Sch. pombe gegenüber CHX zu bestimmen, wurden Kulturen mit verschiedenen CHX Konzentrationen angesetzt, das Wachstum der Kulturen im Lumetron Colorimeter über 20 Stunden hinweg verfolgt und mit dem Wachstum der Kontrollen ohne CHX verglichen.

Eine Kultur von Sch. pombe wurde in 11 aliquote Teile geteilt, denen CHX in Konzentrationen von 0 bis 0,5 mg/ml zugesetzt wurde. Die Wachstumskurven der Kulturen mit CHX Konzentrationen von 0,4 bis 0,5 mg/ml lassen sich zu einer Kurve zusammenfassen und ebenso der Wachstumsverlauf der Kulturen mit Konzentrationen zwischen 0,02 und 0,35 mg/ml. CHX hemmt die Zellvermehrung bei Sch. pombe, schon Konzentrationen von 0,02 mg/ml zeigen eine starke Hemmwirkung. Ab 0,4

mg/ml konnte keine Titerzunahme mehr festgestellt werden, Abb (I 1).

Nachdem der Wachstumstest mit CHX zeigt, daß Sch. pombe sensibel gegenüber diesem Antibiotikum ist, sollte untersucht werden, ob CHX die Proteinsynthese bei Sch. pombe hemmt.

I. 2.) Einbau radioaktiv markierten Leucins in die Zellproteine von Sch. pombe (MICHEL et al. 1971)

Logarithmisch wachsende Zellen wurden, wie unter B. IV. 2.) angegeben ist, mit verschiedenen CHX Konzentrationen und ^3H -Leucin 15 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Pulsmarkierung wurden die Zellen geerntet, die Proteine ausgefällt und ihre Radioaktivität gemessen. Kontrollen ohne CHX dienten als Bezugssystem, siehe Abb. (I 2).

Mit steigender CHX Konzentration nimmt die in das Protein inkorporierte Menge an ^3H -Leucin ab. Sie beträgt bei 0,4 mg/ml noch etwa 5 % der Kontrolle ohne CHX. Eine Steigerung der Konzentration auf ein mg/ml läßt keine weitere Zunahme der Hemmung beobachten, Abb. (I 2).

I. 3.) Einbau radioaktiv markierten Adenins in die DNS-Fraktion von Sch. pombe in Gegenwart von CHX

Um die DNS-Synthese unter dem Einfluß von CHX bei Sch. pombe zu untersuchen, wurden logarithmisch wachsende Zellkulturen der Adenin-Mangelmutante 50 h⁻ade7 mit 0,2 mg CHX/ml 15 Minuten vorinkubiert und mit ^3H -Adenin in Gegenwart von CHX inkubiert. Die in die DNS eingebaute Menge ^3H -Adenin wurde nach der Methode von HARTWELL (1967) bestimmt und mit den

Einbauwerten der Kontrollen verglichen, Abb. (I 3). Nach 50 Minuten Inkubation mit ^3H -Adenin in Gegenwart von CHX werden noch 12 % der in den Kontrollen ohne CHX eingebauten Menge ^3H -Adenin in die DNS-Fraktion inkorporiert, Abb. (I 3). Auch in Sch. pombe wird die DNS-Synthese durch CHX gehemmt.

I. 4.) Reversible Hemmwirkung von CHX

Sch. pombe Kulturen wurden unter Belüftung 6 Stunden mit 0,2 mg CHX/ml inkubiert. Vor Zugabe von CHX und nach 6 Stunden wurden Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit Acetatpuffer 0,2 M gewaschen und auf YEP-Glucose-Medium plattiert. Die Befähigung zur Koloniebildung ging durch die Inkubation mit CHX nicht irreversibel verloren. Die Hemmung der Zellvermehrung konnte vielmehr durch Entfernen des Antibiotikums vollständig aufgehoben werden, Tabelle (I 1).

C. II.) Sistieren des Zellstoffwechsels durch tiefe Temperaturen

Wie einleitend erwähnt, gelingt es durch Zerfall eingebauten radioaktiv markierten Phosphors (^{32}P) in die Struktur der DNS, neben einer hohen Inaktivierungsrate der Zellen (FUERST und STENT 1957) auch Mutanten zu erzeugen (KAUDEWITZ et al. 1958; KAUDEWITZ 1961). Nach erfolgter Markierung der Zellen ist die Neuaufnahme unmarkierten Phosphors zu vermeiden, da mit zunehmender Zahl an Zellgenerationen eine Verdünnung der spezifischen Radioaktivität eintreten und dadurch ihre Wirkung abschwächen würde.

Der bakterielle Stoffwechsel kann durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (KAUDEWITZ et al. 1958) oder durch Gefriertrocknen der Zellen reversibel ausgeschaltet werden. Für Sch. pombe wird im folgenden die Suche nach Versuchsbedingungen geschildert, die geeignet sind, den Zellstoffwechsel reversibel zu sistieren.

II. 1.) Biophysikalische Grundlagen des Einfrier- und Auftauprozesses

Beim Einfrieren von biologischem Material bilden sich im extrazellulären Raum Eiskristalle. Langsames Einfrieren läßt dabei große Kristalle entstehen. Während ihres Wachstums verwandeln sie das gesamte verfügbare intra- und interzelluläre Wasser in Eis. Dies führt zur Dehydration der Zellen, um so mehr, je tiefer die Temperatur absinkt. Ein Maximum der Dehydration wird bei -10°C erreicht. Etwa 5 bis 10 % des Wassers in der Zelle bleibt als sog. "gebundenes Wasser" erhalten (MERYMAN 1960). Eine Zerstörung der Zellstrukturen durch Eiskristalle ist

nicht in erster Linie für die zellschädigende Wirkung des Gefriervorganges verantwortlich. Vielmehr kommt es durch das Einfrieren des "freien Wassers" zur Hypertonie der Elektrolyte, und damit zur Denaturierung der Proteine, die den Zelltod nach sich zieht (LOVELOCK 1953 a, b). Ihr Maximum liegt im Temperaturbereich zwischen -5°C und -10°C . Langsames Abkühlen begünstigt diesen Hypertonie-Effekt (LOVELOCK 1953 b). Durch Zugabe von Glycerin kann der Anteil des "gebundenen Wassers" erhöht werden und steht als Lösungsmittel für die Salze extra- und intrazellulär zur Verfügung. LOVELOCK (1953 b) spricht von der salzpuffernden Wirkung des Glycerin.

Obwohl rasches Abkühlen zur Umgehung des Hypertonie-Effektes notwendig ist, kommt es dabei in den Zellen zum sog. thermalen Schock (MERYMAN 1957, 1960). Die gefrorenen Zellbestandteile haben, wie unterschiedliche Materialien verschiedene Ausdehnungskoeffizienten, wodurch Spannungszustände und Brüche innerhalb des gefrorenen Zellmaterials auftreten.

Die durch rasches Einfrieren entstandenen kleinen Kristalle rekristallisieren beim Verweilen in tieferen Temperaturbereichen (Devitrifikation) auch innerhalb der Zelle. Diese Devitrifikation (LUYET 1960) kann durch Aufbewahren des biologischen Materials bei sehr tiefen Temperaturen, wie sie der flüssige Stickstoff aufweist, vermieden werden. Sie tritt aber auch ein, wenn schnell eingefrorene Zellen langsam aufgetaut werden. Ein rasches Auftauen ist deshalb immer gefordert, zumal dabei eine Schädigung durch den oben erwähnten thermalen Schock nicht auftritt (SMITH 1954). LOVELOCK (1953 a) zeigte an roten Blutkörperchen, daß eine Verweildauer von weniger als 5 Sekunden im Temperaturbereich zwischen -5°C und -40°C kaum Schädigungen der Zellen nach sich zieht. Vollständige Haemolyse trat ein bei einer Verweildauer

von mehr als 30 Sekunden. Das gilt für das Einfrieren wie für das Auftauen der Zellen. Als kritischer Temperaturbereich wird der zwischen dem Gefrierpunkt der Lösung, Beginn der Hypertonie der Salzlösung, und dem kryohydratischen Punkt der Salz-Wasser-Mischung angegeben.

II. 2.) Einfluß verschiedener Gefrierverfahren auf die Befähigung zur Koloniebildung bei Sch. pombe

a.) Gefriertrocknen der Zellen:

Zellen von Sch. pombe wurden in Magermilch suspendiert, zu einem Titer von 1×10^8 /ml, in der Gefriertrockenanlage GAMMA der Firma Christ bei $- 50^{\circ} \text{C}$ eingefroren und bei Temperaturen zwischen $- 10^{\circ} \text{C}$ und $- 40^{\circ} \text{C}$ getrocknet.

b.) Einfrieren und Aufbewahren der Zellen bei $- 20^{\circ} \text{C}$:

Sch. pombe wurde in YEP-Glucose-Medium, dem Glycerin zu 10 % zugegeben war, in 0,1 ml Portionen zu einem Zelltitert von 8×10^7 /ml bei $- 20^{\circ} \text{C}$ eingefroren und gelagert.

c.) Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und Aufbewahren bei $- 20^{\circ} \text{C}$:

Zellen von Sch. pombe wurden in YEP-Glucose-Medium, das 20 % Glycerin enthielt, aufgenommen, in 0,1 ml Portionen auf kleine Gläschen, mit einem Bodendurchmesser von 15 mm, verteilt, in flüssigen Stickstoff eingetaucht ($- 196^{\circ} \text{C}$) und anschließend mit dem Stickstoff in eine $- 20^{\circ} \text{C}$ Kühltruhe gebracht. Aufgrund seines hohen Dampfdruckes entweicht der flüssige Stickstoff und die Zellen lagern bei $- 20^{\circ} \text{C}$.

d.) Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und Lagern bei -80°C :

Wie c.) jedoch Aufbewahren in der Tiefkühltruhe bei -80°C .

e.) Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und Lagern in flüssigem Stickstoff:

Wie c.) jedoch Verbleib der Zellen im flüssigen Stickstoff.

f.) Schrittweises Einfrieren der Zellen und Aufbewahren in flüssigem Stickstoff:

Zellen von Sch. pombe wurden wie unter c.) vorbereitet. Um den kritischen Temperaturbereich rasch unterschreiten zu können, wurden die Proben während 2 1/2 Stunden auf $+4^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt. Vorkühlen auf Eisbadtemperatur wirkte sich ungünstig auf die Koloniebildungspotenz der Zellen aus. Mit den so vorbereiteten Zellen konnte der kritische Temperaturbereich rasch unterschritten werden. Der thermale Schock, der durch zu rasches Abkühlen auf die Temperatur des flüssigen Stickstoff zu beobachten ist (MERYMAN 1957, 1960), siehe auch Tabelle (II 1), wurde durch 15 Minuten langes Einhängen der Zellproben in den Dampf des flüssigen Stickstoff vermieden. Das entspricht dem Aufenthalt bei etwa -80°C . Erst danach wurden die Proben in den flüssigen Stickstoff eingetaucht und, um die Rekristallisation zu vermeiden, darin aufbewahrt. In Tabelle (II 1) ist abzulesen, wie stark das Koloniebildungsvermögen der Zellen durch die Rekristallisation in weniger tiefen Temperaturbereichen abnimmt.

Das Auftauen der Zellproben erfolgte im Gegensatz zum Einfrieren nicht schrittweise, sondern sehr rasch in einem 40°C warmen Wasserbad. Warme Zimmerluft genügte nicht, um diesen Prozeß mit optimaler

Geschwindigkeit ablaufen zu lassen.

Die Ergebnisse der geschilderten Experimente sind in Tabelle (II 1) zusammengefaßt. Die Methode unter 2. f.) erbrachte die besten Ergebnisse und wurde für die weiteren Versuche ausgewählt.

C. III.) Radioaktiver Zerfall und Mutagenese

III. 1.) Einfluß des radioaktiven Zerfalls von ^{32}P auf die Befähigung zur Koloniebildung von Sch. pombe

Nachdem logarithmisch wachsende Zellen von Sch. pombe, wie unter B. IV. 1.) beschrieben, radioaktives Orthophosphat (^{32}P) in Gegenwart von CHX aufgenommen hatten, wurden die Zellen in 0,1 ml Portionen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Durch das Experimentieren unter Strahlenschutzbedingungen ergab sich eine experimentelle Schwankung der Zellmenge in den einzelnen Proben von $s = \pm 13,4 \%$. (Diese experimentelle Schwankung wurde in einer Kontroll-Versuchsreihe aus 11 Proben ermittelt, wobei pro Probe etwa 2000 Kolonien zur Auszählung kamen, Abb. (III 1)). Die Radioaktivität des gesamten Inkubationsansatzes, der Zellen und des verbleibenden Überstandes war im Szintillationszähler bestimmt worden, Tabelle (III 1). Sofort und in mehrtägigen Abständen erfolgte die Kontrolle der Koloniebildungsbefähigung der behandelten Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen langen Zerfallsintervallen des inkorporierten ^{32}P . Dazu wurden die Zellproben aufgetaut und auf YEP-Glucose-Medium plattiert, wobei pro Versuchspunkt etwa 25 Platten mit je 100 - 200 Kolonien ausgezählt wurden. Abb. (III 1) zeigt, daß der Anteil der Überlebenden in allen

Versuchspunkten im Bereich der experimentellen Schwankung liegt. Um zu prüfen, ob innerhalb dieses Schwankungsbereiches mit zunehmender Zerfallszeit des ^{32}P eine Abnahme der Koloniebildungsbefähigung stattgefunden hat, wurden die Titerwerte im Wahrscheinlichkeitsnetz (Fa. Carl Schleicher & Schüll, Einbeck/Han. 298 1/2 A3) untersucht. Sie zeigten hierbei eine Normalverteilung. Somit läßt sich an dem zur repräsentativen statistischen Behandlung ausreichenden Material keine statistisch sicherbare Abnahme der Koloniebildungspotenz in Abhängigkeit vom zunehmenden Zerfall des inkorporierten ^{32}P feststellen (CAVALLI-SFORZA 1972).

III. 2.) Anreicherung und Selektion der mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten

a.) Anreicherung von RD-Mutanten mit Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC):

Chromosomale RD-Mutanten sind sowohl bei Sch. pombe als auch bei S. cer. sehr selten (WOLF et al. 1971). Extrachromosomale RD-Mutanten von Sch. pombe konnten überhaupt noch nicht isoliert werden. Es ist deshalb erforderlich, trotz der erhofften Erhöhung der Mutationsrate durch Mutagene, die entstandenen Mutanten anzureichern. In der Hefegenetik hat sich das Anreicherungsverfahren mit Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC) als am besten geeignet gezeigt. Es läßt sich mit geringfügiger Abwandlung auch für Sch. pombe verwenden. RD-Mutanten von Hefe bilden auf TTC halbtigem Medium weiße Kolonien, während das Wachstum atmender Hefezellen unterdrückt wird (BROCK 1958; ZSOLT 1960).

b.) Anreicherung der mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten auf YEP-TTC-Medium:

Die mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten wurden auf TTC-haltigem Festmedium angereichert. Da eine hohe Glucosekonzentration die Atmung reprimiert, (BECK und MEYENBURG 1968) würden sich trotz der Anwesenheit von TTC RD-Mutanten und RC-Zellen gleich schnell vermehren (BACHOFEN 1970). Auf Festmedium sinkt jedoch wegen der geringen Diffusionsgeschwindigkeit der Glucose deren Konzentration im Koloniebereich rasch ab, was zur Dereprimierung der Atmung und damit zur Hemmung der atmenden Zellen durch TTC führt. Somit werden RD-Kolonien früher sichtbar als RC-Kolonien und können isoliert werden.

Die mit ^{32}P inkubierten und in flüssigem Stickstoff sistierten Zellen wurden in mehrtägigen Intervallen aufgetaut, auf YEP-TTC-Platten, deren Präparation sehr sorgfältig standardisiert worden war, ausplattiert und durch paralleles Plattieren auf YEP-Glucose-Medium die Zahl der zur Koloniebildung befähigten Zellen, die auf YEP-TTC-Medium ausplattiert worden waren, bestimmt. Jede YEP-TTC-Platte enthielt $1 - 5 \times 10^4$ vermehrungsfähige Zellen.

Nach spätestens 4 Tagen traten auf den YEP-TTC-Platten große, weiße Kolonien, kleine, weiße Kolonien und rot-gemaserte Kolonien auf. Je nach Anteil des zerfallenen ^{32}P war der Anteil der verschiedenen Kolonietypen unterschiedlich groß, Abb. (III 2). Die genannten Kolonien wurden sofort isoliert und in YEP-Glucose-Flüssigmedium überimpft. Gleichzeitig wurde ein Ausstrich auf YEP-Glycerin-Medium angelegt, um zwischen TTC-resistenten und RD-Kolonien zu unterscheiden.

Da das YEP-TTC-Medium lediglich zur Anreicherung der RD-Mutanten dient und keine klare Entscheidung zwischen oxidativem und nicht-oxidativem Stoffwechsel

der Zellen zuläßt, wurde die Befähigung zur Koloniebildung auf YEP-Glycerin-Medium geprüft. Die Zellen, welche auf Grund einer Resistenz gegenüber TTC Kolonien auf YEP-TTC-Medium zu bilden vermochten, konnten somit aus dem Versuchsansatz ausgeschieden werden. Das Interesse der weiteren Untersuchungen galt allein den RD-Mutanten.

c.) Mutationsrate der genetisch bedingten Befähigung auf YEP-TTC-Medium Kolonien zu bilden:

Die Häufigkeit, mit der auf YEP-TTC-Medium Kolonien auftreten, bezogen auf die Zahl der überlebenden Zellen, ist als Funktion des Ausmasses des radioaktiven Zerfalls von ^{32}P in Abb. (III 2) dargestellt, die experimentell ermittelten Werte dazu zeigt Tabelle (III 2). Werden die Mutationsraten zu den verschiedenen Phänotypen auf YEP-TTC-Medium, d. h. zu rot-gemaserten und weißen Kolonien getrennt als Funktion des Ausmasses des radioaktiven Zerfalls aufgetragen, so ergeben sich zwei Kurven mit unterschiedlichem Anstieg, Abb. (III 2). Der Anteil der weißen Kolonien auf YEP-TTC-Medium ist von Anfang an größer als der rot-gemaserten Kolonien, nämlich $9,9 \pm 1,2 \times 10^{-6}$ gegenüber $6,2 \pm 0,9 \times 10^{-8}$, Tabelle (III 2). Er wird durch den Radioaktiven Zerfall von ^{32}P jedoch nur um etwa eine Zehnerpotenz gesteigert, von $9,9 \pm 1,2 \times 10^{-6}$ auf $1,3 \pm 0,05 \times 10^{-4}$. Rot-gemaserte Kolonien treten spontan viel seltener auf als weiße. Die spontane Mutationsrate der rot-gemaserten Kolonien beträgt $6,2 \pm 0,9 \times 10^{-8}$, sie wird durch den radioaktiven Zerfall auf $4 \pm 0,15 \times 10^{-4}$ gesteigert, Abb. (III 2) und Tabelle (III 2).

d.) Selektion der mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten:
Von YEP-TTC-Medium isolierte Kolonien wurden auf YEP-Glucose-Medium ausgestrichen, bei 30°C inkubiert und die gewachsenen Kolonien mittels eines Samtstempels auf YEP-Glycerin-Medium übertragen. Die Makrokolonien, deren Stempelabdrücke auf YEP-Glycerin-Medium nicht weiter wachsen, werden als atmungsdefekt bezeichnet (EPHRUSSI 1953). Die Stempelabdrücke der von YEP-TTC-Medium isolierten Kolonien wuchsen nahezu alle (Ausnahmen siehe Kapitel C. IV. 6.) zu Kolonien heran.

Ein ähnliches Verhalten von Sch. pombe war nach Behandlung mit Ethidiumbromid und Acridinen beobachtet worden (TRENINA et al. 1965; HESLOT et al. 1970 b; SCHWAB et al. 1971). Diese Mutagene induzieren bei S. cer. ausschließlich und mit hoher Effektivität mitochondriale RD-Mutanten.

Da fast alle von YEP-TTC-Medium isolierten atmungsdefekten Kolonien auf YEP-Glucose-Platten zu atmungskompetenten Kolonien heranwuchsen, wurden sie in YEP-Glucose-Flüssigmedium überimpft. Subkultivierung in frisches Medium verhinderte, daß die RD-Kulturen die stationäre Phase und damit den RC-Zustand erreichten, wie es bei den RD-Kolonien auf YEP-Glucose-Platten zu beobachten ist und im Kapitel C. IV. näher erläutert werden wird.

Alle folgenden Untersuchungen sind an exponentiell wachsenden RD-Kulturen durchgeführt worden. Durch quantitatives Plattieren, (siehe dazu B. IV. 7.), konnte sichergestellt werden, daß bei allen Experimenten homogene RD-Kulturen vorlagen.

e.) Mutationsrate zum RD-Typ in Abhängigkeit vom radioaktiven Zerfall des inkorporierten ^{32}P :
Erst wenn 40 % des inkorporierten ^{32}P zerfallen sind, lassen sich in Stichproben von 200 - 400 von YEP-TTC-Medium isolierten Kolonien RD-Mutanten nachweisen. Um eine genügende Anzahl von RD-Mutanten finden zu können, kamen bis zu 700 YEP-TTC-Platten pro Zerfallsintervall (d. h. pro Versuchspunkt), jeweils mit $1 - 5 \times 10^4$ teilungsfähigen Zellen beschickt, zum Einsatz. Die auf YEP-TTC gewachsenen Kolonien wurden isoliert und ihre Atmungsfähigkeit durch Ausstreichen auf YEP-Glycerin geprüft, Tabelle (III 3). Sind mehr als 40 % des inkorporierten ^{32}P zerfallen, steigt die RD-Mutationsrate exponentiell mit dem Zerfall an ^{32}P an, Abb. (III 3).

Die Mutationsrate zum RD-Typ läßt sich anhand der experimentell ermittelten Daten in Tabelle (III 2) und (III 3) bestimmen:

Anteil der RD-Mutanten an der untersuchten Stichprobe:

$$\text{Anteil RD} = a/b \quad (1)$$

dabei bedeutet (a): Anzahl der gefundenen RD-Mutanten und (b): Zahl der von YEP-TTC-Medium isolierten und auf YEP-Glycerin untersuchten Kolonien.

Anteil der Zellen, die fähig sind, auf YEP-TTC-Medium Kolonien zu bilden: K_{TTC}

$$K_{\text{TTC}} = c/d \quad (2)$$

wobei (c) die Zahl der auf YEP-TTC-Medium gewachsenen Kolonien und (d) die gesamte Zahl der teilungsfähigen Zellen ist, die auf YEP-TTC-Medium ausplattiert worden sind.

Gleichung (1) mit Gleichung (2) multipliziert ergibt die Mutationsrate zum RD-Typ.

Im Bereich zwischen 0,0 und 0,4 ^{32}P zerfallen wurden in den entsprechenden Stichproben zu je 400 von YEP-TTC-Medium isolierten Kolonien keine RD-Mutanten

gefunden, Tabelle (III 3). Das legt die Vermutung nahe, daß erst eine genügende Akkumulation mutierter mitDNS-Moleküle stattgefunden haben muß, damit eine Zelle als RD-Mutante erkennbar wird. Mit salpetriger Säure induzierte E. coli-Mutanten zeigten ihre Auxotrophien phänotypisch ebenfalls erst nach Akkumulation der mutierten Kern-DNS-Moleküle (KAUDEWITZ et al. 1962). Demzufolge ist bei der statistischen Behandlung der Nullereignisse die ganze Irrtumswahrscheinlichkeit den oberen Vertrauensgrenzen zuzuteilen (KOLLER 1969). Die errechneten oberen Grenzen der Nullereignisse sind mit $p = 0,01$ in Abb. (III 3) sowie in Tabelle (III 4) angegeben.

f.) Mutationsrate der RD-Mutanten, die rot-gemaserte bzw. weiße Kolonien auf YEP-TTC-Medium bilden: Der Anteil der RD-Mutanten unter den rot-gemaserten Kolonien auf YEP-TTC-Medium ist höher als unter den weißen Kolonien und bleibt, wenn einmal RD-Mutanten auffindbar sind, trotz Zunahme des Zerfalls des ^{32}P konstant zwischen 83 % und 95 %, Tabelle (III 3). Die RD-Mutanten unter den weißen Kolonien auf YEP-TTC nehmen kontinuierlich mit dem radioaktiven Zerfall des inkorporierten ^{32}P zu, erreichen aber mit maximal 33,8 % nicht den Prozentsatz der rot-gemaserten.

Die RD-Mutationsrate zu diesen beiden Typen sind in Tabelle (III 4) in Abhängigkeit vom Zerfall des inkorporierten ^{32}P dargestellt. Die RD-Mutationsrate zum rot-gemaserten Typ zeigt einen steileren Anstieg als jene zum weißen. Die oberen Grenzen der spontanen Mutationsrate kann für den rot-gemaserten Typ mit 10^{-9} und für den weißen mit 1×10^{-7} angegeben werden. Durch die Zunahme des Zerfalls des inkorporierten ^{32}P wird die RD-Mutationsrate

zum rot-gemaserten Typ auf $3,19 \times 10^{-4}$ und zum weissen auf $3,85 \times 10^{-5}$ erhöht.

Wie die genetische Analyse der RD-Mutanten in IV. 4.) zeigt, treten chromosomale RD-Mutanten nur innerhalb des weissen Typs auf. Der rot-gemaserte Typ zeigt in allen untersuchten Fällen eine nicht-mendelnde Spaltung des Atmungsdefektes.

g.) Untersuchung der rot-gemaserten Kolonien:

KAUDEWITZ et al. (1958) fanden bei E. coli nach Behandlung der Zellen mit ^{32}P auxotrophe Kolonien mit mehr oder weniger großen Sektoren aus prototrophen Zellen. Um zu klären, ob es sich bei den rot-gemaserten Kolonien um eine Erscheinung handelt, die den sektorierten Kolonien vergleichbar ist, wurden die rot-gemaserten Kolonien isoliert, suspendiert und $1 - 5 \times 10^6$ teilungsfähige Zellen auf YEP-Glycerin- und YEP-Glucose-Medium plattiert. 95 % aller auf diese Weise untersuchten Kolonien bestanden homogen aus RD-Zellen.

III. 3.) Mutagene Wirkung des Zerfalls von in die mitDNS inkorporierten ^{32}P :

Das Entstehen von RD-Mutanten in Abhängigkeit von der Zerfallszeit des in die mitDNS inkorporierten ^{32}P , Abb. (III 3), zeigt einen sigmoiden Verlauf und stellt eine Summenhäufigkeits- oder Dosiswirkungskurve dar (CAVALLI-SFORZA 1972). Die RD-Mutanten sind in diesem Falle das Ergebnis der Wirkung des radioaktiven Zerfalls. Wird nun die relative Wirkung des ^{32}P -Zerfalls, d. h. die Wirkung zur Zeit t pro der maximalen Wirkung, logarithmisch gegen den Anteil der zerfallenen ^{32}P -Atome aufgetragen, so ergibt sich eine

Kinetik der Mutationsauslösung. Wie FUERST und STENT (1957) nachwiesen, beruht die Abtötung von Bakterien durch den intrazellulären ^{32}P -Zerfall vorwiegend auf Zerfällen des in die DNS inkorporierten ^{32}P . In Abb. (III 4) ist die Mutationskinetik der RD-Mutanten dargestellt. Um sie analog der Abtötungskinetik bei Bakterien (KAUDEWITZ et al. 1958) abhandeln zu können, ist $\lg_{10}(1 - \frac{\text{RD}}{\text{RD}_{\text{max}}})$ gegen den radioaktiven Zerfall aufgetragen. Hierbei ist RD: die Zahl der RD-Mutanten pro 10^7 RC-Zellen zum Zeitpunkt t und RD_{max} : die maximale Anzahl gefundener RD-Mutanten pro 10^7 RC-Zellen. Der lineare Bereich der Kurve kann durch die Gleichung $\lg_{10}(1 - \frac{\text{RD}}{\text{RD}_{\text{max}}}) = -K \cdot f$ beschrieben werden (wobei f der Anteil der zerfallenen ^{32}P -Atome ist). Die Gültigkeit der Gleichung für biologische Objekte wurde von HERSHEY et al. (1951) an Phagen und von KAUDEWITZ et al. (1958) an Bakterien nachgewiesen. Eine Anfangskrümmung der Kurve in Abb. (III 4) ist auch von FUERST und STENT (1957) und von KAUDEWITZ et al. (1958) bei der Inaktivierung von Bakterienzellen durch die Inkorporation von ^{32}P gefunden worden.

Bis zur ersten Halbwertszeit des inkorporierten ^{32}P sind noch nicht genügend mit DNS-Stränge getroffen worden, um RD-Mutanten entstehen zu lassen. Ab etwa 50 % ^{32}P zerfallen nähert sich der Kurvenverlauf einer Eintrefferkurve. Die Trefferzahl, die notwendig ist, um eine RD-Mutante zu induzieren, läßt sich graphisch durch Extrapolation des linearen Anteils des absteigenden Astes der Kurve auf die Ordinate ermitteln (FUERST und STENT 1957). Analog zur Abtötungskinetik bei Bakterien (KAUDEWITZ et al. 1958) spiegelt sich in der Trefferzahl der Mutationskinetik der Abb. (III 4) die mittlere Zahl der "empfindlichen Einheiten" wieder, die mutiert sein müssen, damit eine RD-Mutante aus einer RC-Zelle entsteht. Demnach können zwischen

35 und 40 solcher Einheiten pro Zelle angenommen werden, die genetisch verändert sein müssen, um eine RD-Mutante entstehen zu lassen.

III. 4.) Beeinflussung der Ergebnisse durch Versuchsparameter

a.) Kältebehandlung:

Unter jeweils den gleichen Versuchsbedingungen wurden Zellen ohne ^{32}P -Zugabe inkubiert, eingefroren und in mehrtägigen Abständen aufgetaut. Die Befähigung zur Koloniebildung, durch Plattieren der Zellen auf YEP-Glucose-Medium bestimmt, zeigte keine signifikante Abnahme infolge der Kältebehandlung, wie in Tabelle (III 5) dargestellt ist.

b.) Radioaktive Strahlung:

Der radioaktive Zerfall des ^{32}P ist von einer energiereichen β -Strahlung begleitet, $E_{\text{max}} = 1,7 \text{ MeV}$. Die mittlere Reichweite in wässrigem Milieu, wie es Gewebe oder Zellsuspensionen darstellen, beträgt etwa 0,9 cm. Um eine inaktivierende und mutagene Wirkung der Strahlung festzustellen, ist es demnach unwichtig, ob der ^{32}P in die Zellen eingebaut worden ist oder sich in der Zellsuspension befindet, denn die Zellgröße von Sch. pombe (5 - 20 μ) ist klein gegenüber der mittleren Reichweite der β -Teilchen.

Zur Ermittlung der Strahlenwirkung wurden Zellen unter den gleichen Bedingungen wie beim Einbau des ^{32}P behandelt. Der ^{32}P wurde jedoch erst unmittelbar vor dem Einfrieren zu den Zellen gegeben. In einem Versuch war es diejenige Menge an Radioaktivität pro Zellkonzentration, die im Einbauversuch nach Auswaschen der Zellen mit Puffer in den Zellen nachgewiesen

werden konnte. In einem zweiten Versuchsansatz wurde die zehnfache Menge an Radioaktivität pro gleicher Zellmenge unmittelbar vor dem Einfrieren zu der Zellsuspension gegeben. Tabelle (III 6) zeigt, daß selbst zehnfache Strahlendosis keine signifikante Letalwirkung hatte. Die Mutationsrate der Atmungsdefizienz ließ sich mit der Strahlenwirkung allein nicht erhöhen. Die Häufigkeit der Zellen, auf YEP-TTC-Medium Kolonien zu bilden, zeigt ebenfalls keine signifikante Veränderung gegenüber dem Spontanwert, Tabelle (III 6).

c.) Toxische Beimischungen der ^{32}P -Lösung:

Das radioaktive Orthophosphat kommt in wässriger Lösung zum Einsatz. Dabei besteht die Möglichkeit, daß Schwermetall-, vor allem Arsenionen in dieser Lösung vorhanden sind (KAUDEWITZ et al. 1958), welche eine toxische Wirkung auf die Zellen haben und somit die Versuchsergebnisse unkontrollierbar beeinflussen können. Um dies abzuklären, wurde eine Probe der radioaktiven Orthophosphatlösung 11 Monate steril aufbewahrt und danach wie im Einbauversuch verwendet. Nach fünfstündiger Inkubation der Zellen mit dieser Lösung wurden die Zellen geerntet, zweimal gewaschen und auf YEP-Glucose- und YEP-TTC-Medium ausplattiert. Die Tabelle (III 7) zeigt, daß die Befähigung zur Koloniebildung sowohl auf YEP-Glucose- als auch auf YEP-TTC-Medium nicht signifikant beeinflusst worden ist. Eine Erhöhung der RD-Mutationsrate war ebenfalls nicht zu beobachten, wie die Plattierungen auf YEP-Glycerin-Medium ergaben.

C. IV.) Charakterisierung der mit ^{32}P induzierten
RD-Mutanten

IV. 1.) Verhalten in der Kultur

a.) Verhalten der RD-Mutanten in kontinuierlicher
YEP-Glucose-Kultur:

Die von YEP-TTC-Medium isolierten Kolonien wurden in YEP-Glucose-Flüssigmedium überimpft und bei 30°C inkubiert. In mehrstündigen Intervallen entnommene Proben sind zur Bestimmung der Koloniebildungs-Befähigung auf YEP-Glucose-Medium und gleichzeitig in verschiedenen Verdünnungen auf YEP-Glycerin-Medium plattiert worden, um die Homogenität der RD-Kulturen zu prüfen, Tabelle (IV 1). Pro Probe wurden $1 - 5 \times 10^6$ zur Koloniebildung befähigte Zellen auf YEP-Glycerin-Medium plattiert, auf eine Platte jedoch nie mehr als $1 - 5 \times 10^4$, um Wachstumsbehinderung der Zellen untereinander auszuschließen.

Durch regelmäßiges Verdünnen mit frischem YEP-Glucose-Medium gelang es, die RD-Kulturen über 80 Generationen bei 30°C und bei 20°C über mehrere Wochen hin zu subkultivieren, ohne daß in beiden Fällen RC-Zellen nachgewiesen wurden, Tabelle (IV 1).

b.) Verhalten der RD-Mutanten in diskontinuierlicher
YEP-Glucose-Kultur:

Wurden die RD-Mutanten nicht weiter verdünnt, so gingen sie in die stationäre Wachstumsphase über. Aus diesem Wachstumsbereich entnommene Proben auf YEP-Glucose- und YEP-Glycerin-Medium plattiert ergaben identische Koloniezahlen auf beiden Kohlenstoffquellen. Die Zellen der stationären Kultur hatten die Fähigkeit zu atmen wieder erlangt. Das ist an der

RD-Mutante RD-36 in Tabelle (IV 2) gezeigt.

IV. 2.) Verhalten der RD-Mutanten bei verschiedenen Glucosekonzentrationen im Medium

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei dem unter IV. 1. b.) geschilderten Phänomen um eine Auswirkung der Glucoserepression handelt (BECK und MEYENBURG 1968), wurden RD-Kulturen in YEP-Glucose-Medium mit konstanter Glucosekonzentration = 2 % inkubiert. Die Glucosebestimmung erfolgte nach der Methode von YEMM und WILLIS (1954) mit dem Anthron-Reagenz und mit dem Glucose-Teststreifen der Firma Boehringer.

Bei ausreichender Glucose im Medium wurden die RD-Kulturen bei einem etwas höheren Titer stationär als in den Kulturen, in denen die Glucose wachstums-limitierend wirkte, Tabelle (IV 3). Regelmäßig entnommene Proben wurden auf YEP-Glucose und YEP-Glycerin plattiert. Die Proben aus der stationären Wachstumsphase zeigten identische Koloniezahlen auf beiden Kohlenstoffquellen. Obwohl die Glucose in reprimierender Konzentration vorhanden war, erlangten die Zellen die Fähigkeit zu atmen.

Als Kontrollversuch wurden die in YEP-Glucose-Medium wachsenden RD-Kulturen in frisches YEP-Medium ohne Glucose hinein verdünnt. Die hier wachstumslimitierend wirkende Glucose ließ die Kulturen bei einem geringeren Titer stationär werden, als es in Kulturen mit kontinuierlicher Abnahme aller Substrate der Fall ist. Paralleles Plattieren der stationären Zellen auf YEP-Glucose- und YEP-Glycerin-Medium ergab ebenfalls identische Koloniezahlen auf beiden Kohlenstoffquellen, Tabelle (IV 4).

Mit den geschilderten Experimenten kann ausgeschlossen

werden, daß es sich bei der Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit innerhalb einer RD-Kultur um eine Erscheinung der Glucoserepression handelt.

IV. 3.) Erstmaliges Auftreten von RC-Zellen in wachsenden RD-Kulturen

13 verschiedene RD-Kulturen wurden in YEP-Glucose-Medium bei 30° C inkubiert. In achtstündigen Intervallen wurden Proben entnommen, die Gesamtzellzahl mikroskopisch und die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen durch Plattieren auf YEP-Glucose-Medium bestimmt. Pro Probe kamen zusätzlich 1 - 5 x 10⁶ vermehrungsfähige Zellen auf YEP-Glycerin-Medium, um den Anteil entstandener RC-Zellen zu ermitteln. Dabei betrug die maximale Zellzahl pro YEP-Glycerin-Platte 1 - 5 x 10⁴, um Wachstumsbehinderung der Zellen untereinander auszuschließen.

Der Titer der RD-Kultur, bei dem erstmals RC-Zellen feststellbar waren, ist mit (T1), der dabei gefundene Titer der RC-Zellen mit (TRC) und der maximale stationäre Titer der gesamten Kultur mit (TS) bezeichnet, Tabelle (IV 5). In den RD-Kulturen wurden bei achtstündigen Untersuchungsintervallen erstmals RC-Zellen gefunden, wenn die Kulturen Zelltiter von 1,4 - 4,6 x 10⁷/ml erreicht hatten. Das ist der Bereich der Wachstumskurve, in dem die logarithmische Phase in die stationäre Phase übergeht, Tabelle (IV 5) und (IV 2). Um ein Maß für den Wachstumsbereich angeben zu können, in dem RC-Zellen erstmals innerhalb von RD-Kulturen auftreten, wurde das Verhältnis aus den Logarithmen der Titer T1 und TS gebildet: lgT1/lg TS, Tabelle (IV 5). In dem relativ engen Bereich zwischen lgT1/lgTS = 0.9 und 0.96 sind in RD-Kulturen von Sch. pombe erstmals RC-Zellen unter

$1 - 5 \times 10^6$ untersuchten vermehrungsfähigen Zellen nachweisbar. Die dabei gefundene Anzahl RC-Zellen/ml (TRC) betrug zwischen $2,5 \times 10^5$ und $2,5 \times 10^7$. Das ist ein Prozentanteil von 1,8 % bis 96 % an der gesamten Kultur. Nach weiteren acht Stunden Inkubation bei 30°C waren alle Zellen der Kulturen atmungskompetent, Plattierungen auf YEP-Glucose- und YEP-Glycerin-Medium erbrachten identische Koloniezahlen/ml. Die Generationszeit betrug in dieser Wachstumsphase 30 bis 60 Stunden.

Vergleichen der Plattierungstitern mit den durch mikroskopische Auszählung ermittelten Titern, Tabelle (IV 5), zeigt, daß kein Absterben der RD-Zellen in dem untersuchten Wachstumsbereich stattgefunden hat. Das Auftreten der RC-Zellen ist also nicht die Folge einer bevorzugten Zellvermehrung von Revertanten auf Kosten der RD-Mutanten, wie auch durch das Experiment IV. 1. a.) Tabelle (IV 1) ausgeschlossen werden konnte.

IV. 4.) Vererbung des mit ^{32}P induzierten Atmungsdefektes

Die mit ^{32}P induzierten RD-Mutanten wurden logarithmisch wachsenden Kulturen entnommen und mit RC-Partnern des entsprechenden Paarungstyps, wie unter B. IV. 5.) angegeben, gekreuzt. Sowohl die RD-Mutanten als auch die RC-Kreuzungspartner trugen je einen genetischen Marker im Kerngenom. Das Spaltungsverhältnis der bekannten Kernmarker diente als Kontrolle der Kreuzung. Die Kernmarker, die jeweils Auxotrophien bedingten, sowie die Fähigkeit zu atmen wurden den Kreuzungen geprüft, siehe B. IV. 6. und 7.). Mit dem Test auf Heterothallie wurde sichergestellt,

daß reine heterothallische Partner zur Kreuzung kamen, siehe B. IV. 5. c.). Homothallische Zellen würden das Kreuzungsergebnis verfälschen. Die Kreuzungen wurden auf festem Kreuzungsmedium durchgeführt. Die RD-Partner wurden parallel zum Kreuzungsansatz nochmals allein auf Kreuzungsmedium ausgestrichen. Die Kontrolle der Atmungsdefizienz ergab, daß die Bildung der Asci abgeschlossen war, bevor die RD-Mutanten auf dem Kreuzungsmedium die Fähigkeit zu atmen wieder erlangt hatten.

Von 121 untersuchten RD-Mutanten zeigten in der Freisporanalyse 11 eine Aufspaltung von RC : RD wie 2 : 2. Die restlichen 110 Kreuzungen spalteten nicht auf, es verhielt sich RC : RD wie 4 : 0, siehe Tabelle (IV 6). Die 11 (2 : 2) aufspaltenden RD-Mutanten wuchsen als weiße Kolonien auf YEP-TTC-Medium und bildeten auf YEP-Glucose atmungsdefekte Makrokolonien, auch in Flüssigkultur ließen sich bei diesen Mutanten in der stationären Wachstumsphase keine RC-Zellen nachweisen.

Bei der Freisporanalyse wurden die Sporen auf YEP-Glucose-Medium ausplattiert und mittels eines Samstempels auf die entsprechenden Selektionsmedien übertragen. Die Kernmarker *ade7*, *ade6*, *his2* und *leu1* zeigten in den angegebenen Kreuzungen den Mendel'schen Erbgang 2 : 2, Tabelle (IV 6).

12 RD-Mutanten, die in der Freisporanalyse nur atemde Sporen lieferten, wurden der Tetradenanalyse, B. IV. 5. b.) unterzogen, um die Meioseprodukte einzelner Asci untersuchen zu können. Die Sporen der Tetraden wurden mit dem Mikromanipulator getrennt auf YEP-Glucose-Medium ausgelegt und über Nacht bei 30° C inkubiert. Die Mikrokolonien der Sporen wurden mit

einem Agarblöckchen ausgestochen, in YEP-Glucose-Flüssigmedium übertragen und bei 30°C weiter inkubiert. Nach 1 bis 2 Tagen wurden Proben entnommen und die Atmungsfähigkeit der Zellen geprüft. Alle Sporenkulturen waren atmungsfähig, Tabelle (IV 7). Die Tetradenanalyse bestätigte das in der Freisporanalyse gefundene RC : RD Spaltungsverhältnis von 4 : 0.

Um Zellvermehrung der Kreuzungspartner vor der Zygotenbildung auszuschließen, wurden Kreuzungen auf einem extrem stickstoffarmen Medium nach LEUPOLD (1955) angesetzt. Dieses Medium findet vor allem bei der Stabilisierung von Zygoten Verwendung. Für Kreuzungsanalysen eignet es sich weniger, weil darauf nur ein sehr geringer Teil der Zygoten Asci zu bilden vermag. Experimentell wurde wie bei den bereits beschriebenen Kreuzungen auf Malz-Agar vorgefahren. Wie die Tabellen (IV 8) und (IV 9) zeigen, ergeben sich auf diesem Medium prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie bei den Kreuzungen auf Malz-Agar. Die Sporenausbeute liegt jedoch auf dem stickstoffarmen Medium nur zwischen 1 % und 2 % derjenigen auf Malz-Agar.

Werden diese Kreuzungsergebnisse trotz der kleinen Sporenzahlen mit berücksichtigt, so erhöht sich die Zahl der untersuchten RD-Mutanten auf 133, davon zeigen 122 keinen mendel'schen Erbgang für die Atmungsdefizienz.

D.) DISKUSSION

I.) Einfluß von Cycloheximid (CHX) auf die Protein- und DNS-Synthese

Auch bei der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe ist die Proteinsynthese durch CHX hemmbar. Wie an Locusta migratoria (SEBALD et al. 1969) und an Saccharomyces cerevisiae (SCHWEYEN und KAUDEWITZ 1970 und 1971) gezeigt wurde, bleibt die Proteinsynthese der Mitochondrien dabei unbeeinflusst. GROSSMAN et al. (1969) wiesen nach, daß unter dem Einfluß von CHX zusätzlich die Kern-DNS-Synthese gehemmt wird, die mitochondriale DNS-Synthese aber weiter läuft. Bei Sch. pombe wird der Einbau radioaktiv markierten Adenins in die DNS-Fraktion der Zellen unter dem Einfluß von CHX bis auf einen Rest von 15 % gehemmt. Vermutlich ist dieser Resteinbau der mitochondrialen DNS-Synthese zuzuschreiben.

II.) Mutagene Wirkung des inkorporierten radioaktiven Phosphors (^{32}P)

Die radioaktive Umwandlung des in die DNS-Struktur aufgenommenen ^{32}P zu Schwefel führt zu Veränderungen in der DNS. Diese können für die Zelle letal sein oder zu Mutanten führen, wie die Untersuchungen an Phagen und Bakterien zeigen (HERSHEY et al. 1951; FUERST und STENT 1957; KAUDEWITZ et al. 1958; KAUDEWITZ 1961).

Den erschöpfenden Beweis dafür, daß der ^{32}P unter den geschilderten Versuchsbedingungen vor allem in die mitDNS 'inkorporiert' worden ist, würde die bio-physikalische Analyse der Zell-DNS liefern. Im experimentellen Teil dieser Arbeit ist sehr intensiv

daran gearbeitet worden, diesen Nachweis zu erbringen. Die gesamte Zell-DNS von Sch. pombe wurde isoliert und mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation versucht, die mitDNS von der Kern-DNS zu trennen. Da sich die Schwimmdichten der beiden DNS-Typen von Sch. pombe nur sehr wenig unterscheiden: Kern-DNS = 1,695 g/ml und mitDNS = 1,689 g/ml (BOSTOK 1969), ließ sich im Rahmen dieser Arbeit eine eindeutige Trennung der mitDNS von der Kern-DNS nicht durchführen. Es mußten deshalb indirekte Nachweise gefunden werden.

Bei Sch. pombe konnten nach dem radioaktiven Zerfall von inkorporiertem ^{32}P ebenfalls Mutanten isoliert werden. Eine statistisch gesicherte Inaktivierung der Zellen in Abhängigkeit von der zunehmenden Anzahl zerfallener ^{32}P -Atome war nicht zu beobachten. Bei Bakterien betrug die Abtötungsrate durch den intrazellulären ^{32}P -Zerfall (spezifische Radioaktivität 8 - 16 mCi/mg Phosphor) $1 - 5 \times 10^{-3}$ (KAUDEWITZ et al. 1958). Da bei Sch. pombe auch die Zahl der RD-Mutanten, deren Atmungsdefekt chromosomal vererbt wird, klein war, nur 11 von 133 genetisch untersuchten RD-Mutanten, kann angenommen werden, daß der aufgenommene ^{32}P unter dem Einfluß von CHX nur zu geringem Teil in die Kern-DNS inkorporiert worden ist. Die Mutationsrate der RD-Mutanten wurde jedoch vom maximalen Spontanwert 1×10^{-7} auf 3×10^{-4} durch den Zerfall des inkorporierten ^{32}P gesteigert. Daran, sowie an dem nicht mendelnden Vererbungsmodus des Atmungsdefektes des überwiegenden Teils der RD-Mutanten und ihrem Verhalten in der Kultur ist abzuleiten, daß die mutagenen Ereignisse vorwiegend in der mitDNS stattgefunden haben. Eine mutagene Wirkung der radioaktiven β -Strahlung konnte experimentell ausgeschlossen werden.

Die Kontrolle der Lösung, in der ^{32}P geliefert und verwendet wurde, auf toxische Beimengungen ergab ein negatives Ergebnis. Somit ist die Ursache der mutagenen Wirkung nur der Zerfall des inkorporierten ^{32}P .

Die Interpretation der Abtötungskinetik von Bakterien nach intrazellulärem ^{32}P -Zerfall (FUERST und, STENT 1957; KAUDEWITZ et al. 1958) ermöglichte die Abschätzung der "empfindlichen Einheiten", die inaktiviert sein müssen, um die Teilungsfähigkeit der Zelle aufzuheben. Diese inaktivierbaren Einheiten wurden als Kernäquivalente gedeutet und später als solche nachgewiesen (KAUDEWITZ et al. 1958). Analog dazu könnten im Falle Sch. pombe die "empfindlichen Einheiten" als genetische Faktoren, die für die Atmung verantwortlich sind, betrachtet werden. Die Auswertung der Mutationskinetik in Abb. (III 4) zeigt, daß zwischen 35 und 40 "empfindliche Einheiten" angenommen werden können, die genetisch verändert sein müssen, damit eine RD-Mutante entsteht. Die genetischen Faktoren wären dann die mitochondrialen Genome, da jedes Mitochondrium mehrere Genome enthält. An S. cer. wurden vier Genome pro Mitochondrium ermittelt. Dabei handelt es sich um eine sehr konstante Größe. Stammspezifisch ist hingegen die Zahl der Mitochondrien pro Zelle (GRIMES et al. 1974). Die gleichen Autoren ermittelten eine durchschnittliche Zahl der mitochondrialen Genome einer haploiden S. cer. Zelle von 47 ± 5 . Die Molekulargewichtsbestimmungen der DNS und mitDNS, die diesen Untersuchungen zugrunde liegen, befinden sich in guter Übereinstimmung mit denen von BLAMIRE et al. (1972).

Die Molekulargewichtsbestimmungen der mitDNS von GRIMES et al. (1974) erfolgten an Zellen, die unter

dereprimierenden Bedingungen gezüchtet worden waren. Von Sch. pombe wurde ^{32}P in Glycerin-Medium aufgenommen, somit fand der Zerfall des inkorporierten ^{32}P ebenfalls in dereprimierten Zellen statt, und die Ergebnisse können mit den oben genannten Werten verglichen werden.

Wenn angenommen werden kann, daß nur eine bestimmte Anzahl mitochondrialer Genome mutiert sein muß, damit eine RD-Mutante auftritt, läßt sich auch die Erscheinungsform der rot-gemaserten Kolonien diskutieren. Zellen, die rot-gemaserte Kolonien auf YEP-TTC-Medium bilden, besitzen eine heterogene Mitochondrienpopulation aus RD- und RC-Mitochondrien. Die RC-Mitochondrien reduzieren TTC zum roten Formazan. Dieser unlösliche Farbstoff tritt in Form von Schlieren in der Kolonie auf. Damit wird klar, warum die rot-gemaserten Kolonien homogen aus RD-Zellen bestehen. Die ebenfalls noch vorhandenen RC-Genome reichen nicht aus, um den RC-Phänotyp der Zelle auszuprägen.

III.) Vererbungsmodus des mit ^{32}P unter dem Einfluß von CHX induzierten Atmungsdefektes bei Sch. pombe

Die genetische Analyse zeigt, daß die RD-Mutanten, welche nicht die Fähigkeit besitzen, den atemungskompetenten Zustand wiederherzustellen, chromosomale RD-Mutanten sind. Sie wachsen als weiße Kolonien auf YEP-TTC-Medium und verhalten sich wie jene, die unter mutagenen Bedingungen induziert worden waren, die nicht spezifisch extrachromosomale Mutanten erzeugen (HESLOT et al. 1970; WOLF et al. 1971; BACHOFEN et al. 1972)

Der Zerfall des in die mitDNS unter dem Einfluß von

CHX inkorporierten ^{32}P induziert vor allem RD-Mutanten, welche nach Bildung atmungsdefekter Mikrokolonien auf YEP-Glucose-Medium zu atmungskompetenten Makrokolonien heranwachsen und in Flüssigkultur in der stationären Wachstumsphase den atmungskompetenten Zustand wieder erlangen können. Sie verhalten sich wie jene Sch. pombe Zellen, die mit Ethidiumbromid oder Acridinfarbstoffen behandelt worden waren (HESLOT et al. 1970; SCHWAB et al. 1971). Bei der Anreicherung auf YEP-TTC-Medium bilden sie vorwiegend rot-gemaserte Kolonien. Nach Kreuzung dieser RD-Mutanten mit dem atmungskompetenten Wildtyp zeigt sich ein nicht mendelnder Erbgang der Atmungsdefizienz. Obwohl nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, daß die RD-Mutanten vor der Kreuzung den atmungskompetenten Zustand wieder erlangten, spricht dagegen, daß die RD-Mutanten, welche den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren wie die zur Kreuzung verwendeten, zur Zeit der Ascibildung noch nicht atmungskompetent geworden waren.

Beobachtungen an Sch. pombe zeigen (LEUPOLD et al. 1974), daß sich die Kreuzungspartner auf Malz-Agar vermehren und erst am Ende des vegetativen Wachstums Kopulation und Sporulation stattfinden. Bei oberflächlicher Betrachtung könnte geschlossen werden, das Ende des vegetativen Wachstums induziere sowohl die Kopulation der Zellen als auch die Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit. Damit im Widerspruch steht jedoch das Ergebnis des Kontrollexperimentes. Demzufolge kann angenommen werden, daß der Stoffwechselzustand, der zum Auslöser der sexuellen Vermehrung der Zellen wird, verschieden ist von dem, der die Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit bedingt, obwohl die grob wahrnehmbaren Umstände - das Ende des vegetativen Wachstums - die gleichen sind. Leider ist nur sehr wenig über die

biochemischen Reaktionen am Übergang der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase einer Zellkultur bekannt. Wir wissen nicht, welche Regulationsmechanismen wirksam werden, die eine Verlängerung der Generationszeit bedingen. Abnahme der Nährstoffe, Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten, Zelldichte sind Faktoren, die das stationäre Wachstum charakterisieren. Welcher spezielle Faktor aber limitierend auf die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen wirkt, im allgemeinen und auf Sch. pombe im besonderen, darüber ist kaum etwas bekannt.

Auf dem stickstoffarmen synthetischen Kreuzungsmedium für Sch. pombe nach LEUPOLD (1955) findet keine Zellvermehrung der Kreuzungspartner vor der Kopulation statt. Die Zygoten bilden sich nach 13 - 15 Stunden (LEUPOLD et al. 1974). Der Stickstoffmangel induziert hier die Kopulation der Zellen. Nur sehr wenige Zygoten vermögen auf diesem Mangelmedium Ascii zu bilden. Dadurch ist die Sporenausbeute äußerst gering.

Die getrennt auf diesem Medium ausplattierten Kreuzungspartner zeigten ebenfalls keine Zellvermehrung und die RD-Zellen wurden nicht atmungskompetent. Daran wird deutlich, daß Stickstoffmangel wohl den sexuellen Vermehrungszyklus bei Sch. pombe einzuleiten vermag, nicht aber den Auslöser für die Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit darstellt.

Das Verhalten der beschriebenen RD-Mutanten am Übergang vom logarithmischen zum stationären Wachstum sollte ein Anlaß sein, der Frage nachzugehen: was passiert in der Zelle in dieser Stoffwechselphase? Wenn es gelänge, die beschriebenen RD-Mutanten zu stabilisieren, ermöglichten sie, mehr zu erfahren über die Regulation der mitochondrialen Funktionen und ihre Autonomie im Zellstoffwechsel. Induktion

einer zusätzlichen Mutation im mitochondrialen Genom, die das Wiederherstellen der Atmungsfähigkeit verhindert, ähnlich den Rekombinationsmutanten bei E. coli (KAUDEWITZ 1973), könnte hier die Methode der Wahl sein.

Solange die physiologisch-biochemischen Mechanismen, welche die Wiederherstellung der Atmungskompetenz sowie die Einleitung der sexuellen Vermehrung bei Sch. pombe bedingen, nicht aufgeklärt sind, sprechen die vorliegenden Kreuzungsergebnisse für extramitochondriale Vererbung des Atmungsdefektes.

Da, unter den rot-gemaserten Kolonien auf YEP-TTC-Medium bildenden RD-Mutanten, nach der Kreuzung keine 2 : 2 Spaltung der Atmungsdefizienz auftrat, sind bei der Suche nach extrachromosomalen RD-Mutanten vor allem die rot-gemaserten Kolonien von YEP-TTC-Medium zu isolieren.

IV.) Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit innerhalb von Kulturen atmungsdefekter Mutanten

Werden die rot-gemaserten RD-Kolonien von YEP-TTC-Medium in YEP-Glucose-Flüssigmedium übertragen und kultiviert, so finden sich in der stationären Phase 100 % atmungskompetente Zellen. In dem relativ engen Bereich von 0.90 bis 0.96 der Wachstumskurve der RD-Kulturen treten erstmals RC-Zellen auf. Ihr Anteil am Titer der Gesamtkultur liegt sofort sehr hoch, er beträgt 1,8 % - 96 %. Nach wenigen Stunden weiterer Inkubation bestehen die Kulturen vollständig aus atmenden Zellen. Die Umwandlung der RD-Zellen in RC-Zellen erfolgt somit in einem wesentlich kürzeren Zeitraum als die Generationszeit, die in dieser Wachstumsphase etwa zwischen 30 und 60

Stunden beträgt. Wird durch Subkultivierung das Erreichen der stationären Phase verhindert, so bleiben die Zellen atmungsdefekt. Selbst nach 80 Generationen konnten unter diesen Bedingungen keine atmungskompetenten Zellen unter $1 - 5 \times 10^6$ untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Damit kann ausgeschlossen werden, daß Segregation nicht mutierter Mitochondrien oder Reversionen atmungskompetente Zellen entstehen lassen, die sich durch Zellvermehrung in der Kultur anreichern. Auch handelt es sich beim Auftreten von RC-Zellen in RD-Kulturen nicht um eine Erscheinung der Glucoserepression, d. h. der Atmungsstoffwechsel wird nicht durch abnehmende Glucosekonzentration induziert. Wachsen die RD-Mutanten bei konstant gehaltener Glucosekonzentration im Medium in die stationäre Phase, so entstehen dennoch 100 % atmungskompetente Zellen. Es muß angenommen werden, daß die RD-Mutanten selbst, durch intrazelluläre Vorgänge, welche noch diskutiert werden, den Wildtypstatus bezüglich der Atmung wieder herstellen. Die Kulturbedingungen beim Übergang des logarithmischen Wachstums in die stationäre Phase scheinen dafür einen auslösenden Faktor darzustellen.

V.) Mögliche Ursachen für das Wiedererlangen der Atmungsfähigkeit

Auch bei Neurospora crassa, einem obligaten Aerobier, treten atmungsdefekte Mutanten, die sog. mi- oder poky-Mutanten auf. Der mi-Zustand ist weniger extrem als der petite-Zustand bei S. cer.. Die Atmungsenzyme, die bei den petite-Mutanten fehlen, sind bei den mi-Mutanten vermindert vorhanden (GRIFFITHS et al. 1968; BERTRAND und PITTENGER 1968).

In stationärer Kultur sind die mi-Mutanten wieder in der Lage, signifikante Mengen der im wachsenden Zustand fehlenden Atmungsenzyme zu produzieren (BERTRAND und PITTENGER 1972 a).

Obwohl bei oberflächlicher Betrachtung Ähnlichkeit mit den in dieser Arbeit geschilderten RD-Mutanten bei Sch. pombe besteht, handelt es sich doch in beiden Organismen um verschiedene Erscheinungen. Der mi-Zustand scheint die Folge einer Leaky-Mutation zu sein (BERTRAND und PITTENGER 1972 a und b). Er wird wieder erreicht, wenn die Zellen erneut in die logarithmische Wachstumsphase kommen. Hingegen ist das Wiederherstellen des RC-Stoffwechsels bei Sch. pombe ein irreversibler Vorgang. Einmal in der stationären Phase zu RC- gewordene frühere RD-Zellen bleiben RC, auch nach erneuter Kultivierung.

Wie schon an verschiedenen Stellen erwähnt, verhalten sich mit Ethidiumbromid (EB) induzierte RD-Mutanten von Sch. pombe ähnlich wie die hier beschriebenen. Der Wirkmechanismus des EB in Sch. pombe ist noch völlig ungeklärt. In einer anderen petite-negativen Hefe, Klyveromyces lactis, wird die mitDNS unter Einfluß von EB zum großen Teil abgebaut (LUHA et al. 1971). Bei Sch. pombe konnte ein solcher Abbau nicht beobachtet werden (BANDLOW und KAUDEWITZ 1974). In S. cer. werden durch EB mitochondriale RD-Mutanten (petites) induziert, die thermoreversibel sind. Bei Erwärmung auf max. 48° C nimmt die Zahl der unter dem Einfluß von EB entstandenen petites drastisch ab (PERLMAN und MAHLER 1971). Die Autoren postulieren einen metastabilen Prämutationszustand, der durch Membranveränderungen, die sich auf die Replikation der mitDNS auswirkten, gekennzeichnet sei. Ob es sich bei den beschriebenen RD-Mutanten von Sch. pombe auch um einen solchen Prämutationszustand

handelt, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Neuere Arbeiten machen diesen Zustand aber auch für S. cer. unwahrscheinlicher. WHEELIS et al. (1975) sehen auf Grund ihrer Experimente die Ursache dieses Umkehrsystems nicht in einer Membranveränderung, sondern glauben sagen zu können, daß es sich hierbei um Reparaturvorgänge der mitDNS handle. Durch eine EB stimulierte Nuclease sei die mitDNS anfangs in relativ große Fragmente zerlegt worden. Möglicherweise sind bei den mit EB und ^{32}P induzierten RD-Mutanten von Sch. pombe, die hier beschrieben werden, ebenfalls Reparaturmechanismen der mitDNS die Ursache für die Wiederherstellung der Atmungskapazität. Die Frage bleibt jedoch noch offen: warum treten erst am Anfang und in der stationären Wachstumsphase die Reparaturmechanismen oder ihre Produkte phänotypisch in Erscheinung? Denkbar wäre ein mitochondrialens Reparatur-Rekombinationssystem. TOWN, SMITH und KAPLAN (1971) wiesen nach, daß bei E. coli an der Reparatur röntgen-induzierter DNS-Schäden ein schnell und ein langsam arbeitendes Reparatursystem wirksam ist. Das langsam arbeitende System ist durch Gene gesteuert, die für Rekombinationsvorgänge verantwortlich sind. DNS-Replikation wiederum ist notwendige Voraussetzung für den Ablauf der Rekombinationsreparatur.

Photo- und Excissions-Reparatur können bei der Klärung des Umkehrphänomens ausgeschlossen werden. Ihr Wirksamwerden sollte bereits während des logarithmischen Wachstums der Zellen nachweisbar sein, nicht erst an seinem Ende. Die Umkehrsysteme, das thermoreversible sowie das durch Kulturbedingungen induzierte, der RD-Mutanten von Sch. pombe, böten die Möglichkeit, mehr Information über eukaryotische Reparatur-Rekombinationsmechanismen zu erhalten.

Nicht nur die Rekombinationsreparatur, sondern auch die Fähigkeit der mitochondrialen Genome zur Rekombination muß als mögliche Ursache für die Wiederherstellung der Atmungskapazität atmungsdefekter Mutanten diskutiert werden.

Mit Antibiotikaresistenz-Mutanten sind rasche Fortschritte im Verstehen der extrachromosomalen genetischen Systeme bei Eukaryoten erzielt worden. Nachdem genetische Rekombination zwischen mitochondrial codierten Antibiotikaresistenzen bei S. cer. beobachtet worden war (THOMAS und WILKIE 1968; COEN et al. 1970), haben eine Anzahl von Autoren über mitochondriale Rekombination berichtet (RANK 1973; WILKIE und THOMAS 1973; WOLF et al. 1973; LUKINS et al. 1973). Der Mechanismus der mitochondrialen Rekombination und Segregation ist bis jetzt noch unbekannt. Ob er der bakteriellen Konjugation vergleichbar ist, einem Transfer in einer Richtung, von einem Donor zum Akzeptor, wie es in dem Modell von BOLOTTIN et al. (1971) vorgeschlagen wird, oder ob ein anderer Prozeß abläuft, bleibt noch unbeantwortet. Nicht nur genetische Experimente weisen darauf hin, daß zwischen mitochondrialen Markern Rekombinationen stattfinden, sondern auch physikalische Untersuchungen der mitDNS-Moleküle der Eltern und der Nachkommen zeigen die genetische Rekombination auf molekularer Ebene (MICHAELIS et al. 1973).

GOLDTHWAITE et al. (1974) beobachteten bei S. cer., daß die Transmissionshäufigkeit für mitochondriale Marker ungewöhnlich hoch war, wenn sich die Kreuzungspartner vor der Kreuzung einen Tag lang in der stationären Wachstumsphase befunden hatten. Die sich daran anschließende Untersuchung der Inkorporation von ^{14}C -Adenin in die mitDNS während verschiedener Wachstumsphasen von S. cer. Kulturen in Vollmedium

mit 1,5 % Glucose brachte folgendes Ergebnis:
Der Anteil der mitDNS an der gesamten Zell-DNS betrug in der exponentiellen Wachstumsphase 6 %, in der frühen stationären Phase (Zeitpunkt 0) 16,2 % und in der späten stationären Phase (nach 40 Stunden) 25 %. Die Inkorporation des DNS-"precursor" in die mitDNS setzt sich also in der stationären Wachstumsphase weiter fort, obwohl zu dieser Zeit die Kern-DNS-Synthese nahezu aufgehört hat. In dieser Phase relativ hoher Stoffwechselaktivität der mitDNS werden die RD-Mutanten wieder atmungskompetent. Der Stillstand der Zellteilung begünstigt die Anreicherung der mitochondrialen Wildtyp-Genome, die noch in der Zelle vorhanden sind.

Wie in diploiden Zellen, so wurde auch in haploiden Zellen von S. cer. nachgewiesen, daß die Mitochondrien fusionieren und sich teilen (STEVENS 1974). Demzufolge finden auch bei der Vermehrung der mitochondrialen Genome in haploiden Zellen Rekombinationsereignisse statt.

An Hand der geschilderten Ergebnisse läßt sich das Verhalten der RD-Mutanten von Sch. pombe deuten. Die beschriebenen RD-Mutanten besitzen kein intaktes Wildtyp-Plasmon, sondern eine genetisch heterogene Mitochondrienpopulation als Folge der Mutagenese mit ^{32}P . Die in der stationären Wachstumsphase weiter laufende Vermehrung der mitDNS und die dabei stattfindenden Rekombinationen führen zur Wiederherstellung des RC-Zustandes. Dieser kann sich manifestieren, weil anzunehmen ist, daß unter den stationären Wachstumsbedingungen ein Selektionsdruck in Richtung auf den effektiveren Atmungsstoffwechsel ausgeübt wird.

Die Frage, warum nicht auch RD-Zellen als Ergebnis der Rekombinationsereignisse nachweisbar sind, ist

nur mit folgender Annahme zu beantworten: Unter den Wachstumsbedingungen, wie sie die stationäre Phase darstellt, ist der Verlust eines oder mehrerer Gene, die notwendig für das Überleben der Zelle sind, letal (CLARK-WALKER und GABOR MIKLOS 1974). HESLOT et al. (1970 b) fanden, daß Sch. pombe nur 7 - 8 Generationen anaerob zu wachsen vermag. Daran zeigt sich, wie wichtig die mitochondrialen Funktionen für die Vermehrung von Sch. pombe sind.

Aus dem Geschilderten wird klar, warum bisher keine extrachromosomalen RD-Mutanten von Sch. pombe isoliert werden konnten. Eine Makrokolonie auf einer Platte ist eine stationäre Zellkultur, in der auf Grund der Mitochondrienvermehrung der RC-Zustand wieder ausgebildet wird. Demzufolge ist es für die Selektion von RD-Mutanten bei Sch. pombe unter Bedingungen, die bevorzugt extrachromosomale RD-Mutanten erzeugen, wichtig, daß nicht wie bei der üblichen Selektion von RD-Mutanten auf YEP-Glucose-Medium plattiert wird, um dann auf YEP-Glycerin-Medium abstempeln zu können. Die RD-Mutanten müssen von YEP-TTC-Medium, worauf sie angereichert wurden, in Flüssigmedium übertragen und exponentiell wachsend gehalten werden. Nur so wird verhindert, daß unter stationären Kulturbedingungen aus RD-Zellen RC-Zellen werden.

E.) ZUSAMMENFASSUNG

1.) Unter der Einwirkung von Cycloheximid (CHX) wurde in die Spaltheife Schizosaccharomyces pombe radioaktiver Phosphor (^{32}P) zur Induktion atmungsdefekter Mutanten eingebaut. Während des Zerfalls des ^{32}P wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Damit eine möglichst geringe Inaktivierung der Zellen erfolgte, wurde für Sch. pombe die Methode des schrittweisen Einfrierens entwickelt.

2.) Die angewendete Mutationsinduktionsmethode erzeugte neben RD-Mutanten, die auf YEP-TTC-Medium als weiße Kolonien wuchsen, hauptsächlich RD-Mutanten, die auf YEP-TTC-Medium rot-gemaserte Kolonien bildeten. Die auf YEP-TTC-Medium als rot-gemaserte Kolonien wachsenden RD-Mutanten bildeten auf YEP-Glucose-Medium atmungsdefekte Mikrokolonien, die zu atmungskompetenten Makrokolonien heranwuchsen. In Flüssigkultur wurden diese RD-Mutanten in der stationären Phase innerhalb weniger Stunden atmungskompetent. Unter exponentiell wachsenden RD-Mutanten konnten keine atmungskompetenten Zellen nachgewiesen werden.

3.) Die auf YEP-TTC-Medium rot-gemaserte Kolonien bildenden RD-Mutanten zeigten im Kreuzungsexperiment mit dem atmungskompetenten Wildtyp ein Spaltungsverhältnis von Atmungskompetenz zu Atmungsdefizienz wie 4 : 0. Sie sind somit extrakaryotisch codiert.

4.) Die auf YEP-TTC-Medium weiße Kolonien bildenden RD-Mutanten, die weder auf YEP-Glucose-Medium noch in Flüssigkultur in der stationären Phase atmungskompetent wurden, zeigten im Kreuzungsexperiment eine 2 Aufspaltung der Atmungskompetenz zur Atmungsdefizienz und sind somit karyotisch codiert.

5.) Obwohl die Anzahl der Kolonien auf YEP-TTC-Medium kontinuierlich mit dem Ausmaß des Zerfalls an ^{32}P zunahm, traten RD-Mutanten erst nach Ablauf von etwa einer Halbwertszeit auf. Die Mutationskinetik der Induktion mitochondrialer RD-Mutanten ergibt etwa 35 bis 40 "empfindliche Einheiten", die als mitochondriale Genome zu deuten sind..

6.) Die quantitative Analyse der rot-gemaserten Kolonien (auf YEP-TTC-Medium) erbrachte, daß es sich hierbei um reine RD-Mutantenkolonien handelt. Gemäß 5.) ist die rote Maserung auf eine von Zelle zu Zelle verschieden aus mutierten und unmutierten mit DNS-Molekülen zusammengesetzte Population innerhalb der einzelnen Zellen zurückzuführen. Wie das Auftreten rot gefärbter Anteile der RD-Kolonien zeigt, tritt der Phänotyp "Atmungsinkompetenz" auch dann bereits in Erscheinung, wenn in RC-Zellen neben (wohl in der Überzahl vorhandenen) mutierten mit DNS-Molekülen noch solche des Wildtyps vorhanden sind, unter deren indirekter Wirkung TTC zum roten Formazan reduziert wird.

7.) Als mögliche Ursache der Umwandlung atmungsdefekter Zellen zu atmungskompetenten Zellen wird mitochondriale Rekombinations-Reparatur und mitochondriale Rekombination diskutiert.

F.) LITERATURVERZEICHNIS

Bachofen, V.:

2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumchlorid als selektierendes Agens atmungsdefekter Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*.

Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität München (1970)

Baliga, B. S.; S. A. Cohen; H. N. Munro:

Effect of Cycloheximid on the reaction of puromycin with polyribosom-bound peptidyl-tRNA.

FEBS-Letters 8, 249 (1970)

Bandlow, W.; F. Kaudewitz:

Action of ethidium bromide on mitochondrial DNA in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Molec. gen. Genet. 131, 333 (1974)

Beck, C.; H. K. von Meyenburg:

Enzyme pattern and anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation.

J. Bacteriol. 96, 479 (1968)

Bertrand, H.; T. H. Pittenger:

Cytoplasmic mutants selected from continuously growing cultures of *Neurospora crassa*.

Genetics 61, 643 (1968)

Isolation and classification of extranuclear mutants of *Neurospora crassa*.

Genetics 71, 521 (1972 a)

Complementation among cytoplasmic mutants of
Neurospora crassa.

Molec. gen. Genet. 117, 82 (1972 b)

Birnboim, H. C.:

New methods for extraction of ribonucleic acid
and polyribosomes from *Schizosaccharomyces pombe*.
J. Bacteriol. 107, 659 (1971)

Blamire, I.; D. R. Cryer; B. Finkelstein; J. Marmur:
Sedimentation properties of yeast nuclear and
mitochondrial DNA.

J. Mol. Biol. 67, 11 (1972)

Bolotin, M.; D. Coen; J. Deutsch; B. Dujon; P. Netter;
E. Petrochilo; P. P. Slonimski:

La recombinaison des mitochondries chez *Saccharo-*
myces cerevisiae.

Bull. Inst. Pasteur 69, 215 (1971)

Bostok, C. J.:

Mitochondrial DNA in the fission yeast *Schizo-*
saccharomyces pombe.

Biochem. Biophys. Acta 195, 579 (1969)

Brock, T. D.:

Inhibition of growth of yeast by 2,3,5-triphe-
nyltetrazoliumchlorid (TTC).

Naturwissenschaften 45, 216 (1958)

Cavalli-Sforza, L.:

Biometrie - Grundzüge biologisch-medizinischer
Statistik.

Gustav Fischer, Stuttgart (1972)

Clark-Walker, G. D.; G. L. Gabor Miklos:

Mitochondrial genetics, circular DNA and the
mechanism of the petite mutation in yeast.

Genet. Res. Cambr. 24, 43 (1974)

Coen, D.; J. Deutsch; P. Netter; E. Petrochilo;
P. P. Slonimski:

Mitochondrial genetics: I - methodology and
phenomenology.

S. E. B. Symposium XXIV 449, (1970)

Ephrussi, B.:

Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms.

Claredon Press, Oxford, England (1953)

Firkin, C. F.; A. W. Linnane:

Phylogenetic differences in the sensitivity
of mitochondrial protein synthesizing systems
to antibiotics.

FEBS-Letters 2, 330 (1969)

Fuerst, C. R.; G. S. Stent:

Inactivation of bacteria by decay of incorpo-
rated radioactive phosphorus.

J. gen. Physiol. 40, 73 (1957)

Fukuhara, H.:

Informational role of mitochondrial DNA stu-
died by hybridization with different classes
of RNA in yeast.

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 58, 1065 (1967)

Goffeau, A.; A. M. Colson; Y. Landry; F. Foury:

Modifications of mitochondrial ATPase in chro-
mosomal respiratory-deficient mutants of a
"petite-negative" yeast: *Schizosaccharomyces*
pombe 972h⁻.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1448 (1972)

Goldthwaite, C. D.; D. R. Craer; J. Marmur:

Effect of carbon source on the replication and
transmission of yeast mitochondrial genom.

Molec. Gen. Genet. 133, 87 (1974)

Griffiths, A. J. F.; H. Bertrand; T. H. Pittenger:

Cytochrome spectra of cytoplasmic mutants in
Neurospora.

Neurospora Newsletter 13, 16 (1968)

Grimes, G. W.; H. R. Mahler; P. S. Perlman:

Nuclear gene dosage effects on mitochondrial
mass and DNA.

J. Cell. Biol. 61, 565 (1974)

Grossman, L. I.; E. S. Goldring; J. Marmur:

Preferential synthesis of yeast mitochondrial
DNA in the absence of protein synthesis.

J. Mol. Biol. 46, 367 (1969)

Hartwell, L. H.:

Macromolecule synthesis in temperature sensitive
mutants of yeast.

J. Bact. 93, 1662 (1967)

Herman, A. I.; P. S. Griffin:

Respiration deficient mutants in *Saccharomyces*
lactis.

J. Bacteriol. 96, 457 (1968)

Hershey, A. D.; M. O. Kamen; J. W. Kennedy; H. Gest:

The mortality of bacteriophages containing
assimilated radioactive phosphorus.

J. gen. Physiol. 34, 305 (1951)

Heslot, H.; A. Goffeau; C. Luis:

Respiratory metabolism of a "petite-negative"
yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻.

J. Bacteriol. 104, 473 (1970 a)

Segregational respiratory deficient mutants of

a "petite-negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻.

J. Bacteriol. 104, 482 (1970 b)

Kaudewitz, F.; W. Vielmetter; H. Friedrich-Freska:
Mutagene Wirkung des Zerfalls von radioaktivem
Phosphor nach Einbau in Zellen von *Escherichia coli*.

Zeitschrift f. Naturf. 13 b, 793 (1958)

Kaudewitz, F.:

Isotopen bei genetischen Untersuchungen.

In: Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie, 2, Auflage,
Herausgeber: H. Schwiegk und F. Turba, Springer,
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 367 (1961)

Kaudewitz, F.; K. Moebus; H. Kneser:

Mischkolonien auxotropher und Wildtypzellen
nach Behandlung von *Escherichia coli*-Zellen
mit salpetriger Säure.

Zeitschrift f. Naturf. 18 b, 245 (1963)

Kaudewitz, F.:

Molekular- und Mikrobengenetik.

Heidelberger Taschenbücher, Springer, Berlin-
Heidelberg- New York, 141 (1973)

Koller, S.:

Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.

Steinkopf, Darmstadt (1969)

Leupold, U.:

Versuche zur genetischen Klassifizierung adeninabhängiger Mutanten von *Schizosaccharomyces*

pombe.

Arch. Julius Klaus-Stif. Vererbungsforsch. 30,
(15. Jahresber. S. S. G.) 506 (1955)

Physiologisch-genetische Studien an adeninab-
hängigen Mutanten von Schizosaccharomyces pombe,
ein Beitrag zum Problem der Pseudoallelie.

Schweiz. Z. Allgem. Pathol. Bakteriол. 20, 535
(1957)

Genetical methods for Schizosaccharomyces pombe.

In: Methods in cell physiology,

ed. D. M. Prescott Vol. IV, Academic Press

New York-London (1970)

Leupold, U.; H. Gutz; H. Heslot; N. Loprieno:

In: Handbook of Genetics, ed. R. C. King, Plenum
Press, New York-London Vol. 1, 395 (1974)

Lovelock, I. E.:

The haemolyses of human red blood cells by
freezing and thawing.

Biochem. Biophys. Acta 10, 414 (1953)

The mechanism of protective action of glycerol
against haemolysis by freezing and thawing.

Biochem. Biophys. Acta 11, 28 (1953)

Lowry, O. H.; N. J. Rosenbrough; A. L. Farr; R. J.
Randall:

Proteinmeasurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

Luha, A. A.; L. E. Sarcoa; P. A. Whittaker:

Biogenesis of yeast mitochondria. Drug effects

on the petite negative yeast Kluyveromyces lactis.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 396 (1971)

Lukins, H. B.; J. R. Tate; G. W. Saunders; A. W. Linnane:

The biogenesis of mitochondria. 26. Mitochondrial recombination: The segregation of parental and recombinant mitochondrial genotypes during vegetative division of yeast:

Molec. Gen. Genet. 120, 17 (1973)

Luyet, B. J.; P. M. Ghenio:

On the mode of action of glycerol in preventing injury by freezing in embryonic tissues of chick. Science 116, 526 (1952)

Luyet, B.:

On the mechanism of growth of ice crystals in aqueous solutions and on the effect of rapid cooling in hindering crystallisation.

In: Recent research in freezing and drying, ed. A. S. Parkers and A. U. Smith, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1960)

Meryman, H. T.:

Physical limitation of the rapid freezing method. Proc. Roy. Soc. B 147, (1957)

The mechanism of freezing in biological systems.

In: Recent research in freezing and drying, ed. A. S. Parkers and A. U. Smith, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1960)

Michaelis, G.; E. Petrochilo; P. P. Slonimski:

Mitochondrial genetics III. Recombined molecules of mitochondrial DNA obtained from crosses between cytoplasmic petite mutants of

Saccharomyces cerevisiae.

Molec. Gen. Genet. 123, 51 (1973)

Michel, R.; R. J. Schweyen; F. Kaudewitz:

Inhibition of mitochondrial protein synthesis
in vivo by erythromycin in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. Gen. Genet. 111, 235 (1971)

Mitchison, J. M.:

Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*.

In: Methods in cell physiology,
ed. D. M. Prescott Vol. IV, Academic Press,
New York- London 131 (1970)

Nagai, S.:

Unstable and reversible forms of hereditary
respiration deficiency in *Saccharomyces logos*
and *Saccharomyces rosei*.

Antonie von Leeuwenhoek 35, Supplement Yeast
Symposium 1969, C1 - C2 (1969)

Perlman, P. S.; H. R. Mahler:

A premutational state induced in yeast by ethidium bromide.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 261 (1971)

Raut, C.:

Heritable non-genetic changes in yeast by ultraviolet light.

J. Cellular Comp. Physiol. 44, 463 (1954)

Rank, G. H.:

Recombination in 3-factor crosses of cytoplasmically inherited antibiotic resistance

mitochondrial markers in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics 73, 367 (1973)

Roodin, D. B.; D. Wilkie:

The biogenesis of mitochondria.

London: Methuen (1968)

Sebald, W.; Th. Hofstötter; D. Hacker; Th. Bücher:

Incorporation of amino acids into mitochondrial protein of flight muscle of *Locusta migratoria* in vitro and in vivo in the presence of cycloheximid.

FEBS-Letters 2, 177 (1969)

Siegel, M. R.; H. D. Sisler:

Cycloheximid and other glutarimide antibiotics.

In: Antibiotics, mechanism of action,

Herausgeber: D. Gottlieb, P. D. Shaw, Springer,
Berlin- Heidelberg- New York (1967)

Schwab, R.; M. Sebald; F. Kaudewitz:

Influence of ethidium bromide on respiration
in *Schizosaccharomyces pombe*.

Mol. Gen. Genet. 110, 361 (1971)

Schweyen, R. J.; F. Kaudewitz:

Protein synthesis by yeast mitochondria in vivo. Quantitative estimate of mitochondrially governed synthesis of mitochondrial proteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 728 (1970)

Differentiation between mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis in vivo by use of a temperature sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1351 (1971)

Sherman, F.:

Respiration deficient mutants of yeast.

I. Genetics.

Genetics 48, 375 (1963)

Sherman, F.; P. P. Slonimski:

Respiration deficient mutants of yeast.

II. Biochemistry.

Biochem. Biophys. Acta 90, 1 (1964)

Sherman, F.; J. W. Stuart; E. Margoliash; J. Parker;
W. Campell:

The structural gene for yeast cytochrome c.

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 55, 1498 (1966)

Sherman, F.; J. W. Stuart; J. H. Parker; E. Inhaber;
N. A. Shipman; G. J. Putterman; R. L. Gardisti;
E. Margoliash:

The mutational alteration of the primary structure of yeast iso-1-cytochrome c.

J. Biol. Chem. 243, 5446 (1968)

Smith, A. U.

Effects of low temperatures on living cells and tissues.

In: Biological Applications of Freezing and Drying, ed. R. J. C. Harris, Academic Press, New York (1954)

Stevens, B.:

In: Relations nucleocytoplasmiques au cours de la différenciation cellulaire chez quelques organismes unicellulaires.

Colloque Université Paris VII. (1974)

Thomas, D. Y. and D. Wilkie:

Recombination of mitochondrial drug resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 368 (1968)

Town, C. D.; K. C. Smith, H. S. Kaplan:

In: F. Kaudewitz, 396 (1973)

Trenina, G. A.; M. U. Bibikova; L. E. Sarukhanova:

Production of mutants with oxidative defects in various yeast species.

Mikrobiologiya 34, 300 (1965)

Wheelis, L; M. K. Tambath; R. C. Criddle:

Petite-induction and recovery in the presence of high levels of ethidium bromide

Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 838 (1975)

Wilkie, D.:

In: The biogenesis of mitochondria.

(D. B. Roodin, D. Wilkie) Methuen and Co.,

London (1968)

Wilkie, D.; D. Y. Thomas:

Mitochondrial genetic analysis by zygote cell lineages in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics 73, 367 (1973)

Wintersberger, E.; H. Tuppy:

DNS-abhängige RNS-Synthese in isolierten Hefe-Mitochondrien.

Biochem. Z. 341, 399 (1965)

Wintersberger, E.; G. Viehauser:

Function of mitochondrial DNA in yeast.

Nature, London 220, 699 (1968)

Wolf, K.; M. Sebald-Althaus; R. J. Schweyen;

F. Kaudewitz:

Respiration deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe* L.

Molec. Gen. Genet. 110, 101 (1971)

Wolf, K.; B. Dujon; P. P. Slonimski:

Mitochondrial genetics: V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. Gen. Genet. 125, 53 (1973)

Yemm, E. W.; A. J. Willis:

The estimation of carbohydrates in plant extracts by androne.

Biochem. J. 57, 508 (1954)

Zsolt, J.:

Selective action of triphenyl-tetrazoliumchlorid against yeast.

Naturwissenschaften 47, 255 (1960)

G.) ABBILDUNGEN UND TABELLEN

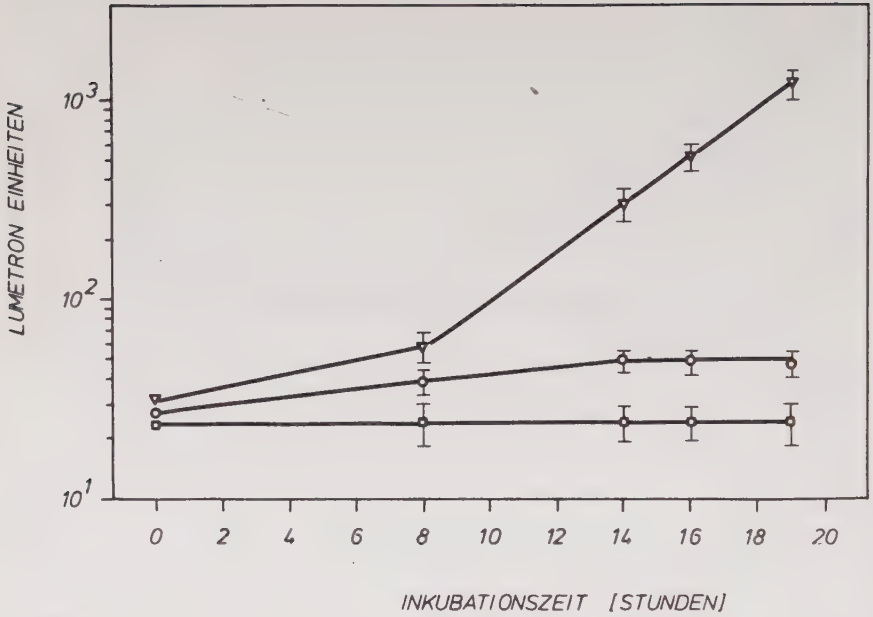


ABB. (I 1)

Zellvermehrung von Sch. pombe 972h⁻ in YEP-Glucose-Medium mit verschiedenen CHX Konzentrationen. Die Inkubation wurde in 5 ml Schüttelkulturen bei 30° C durchgeführt und die Titerzunahme im Lumetron Colorimeter gemessen.

—Δ—Δ— Kontrolle ohne CHX; —○—○—
 0,02 - 0,35 mg CHX/ml; —□—□— 0,40 - 0,50 mg CHX/ml.

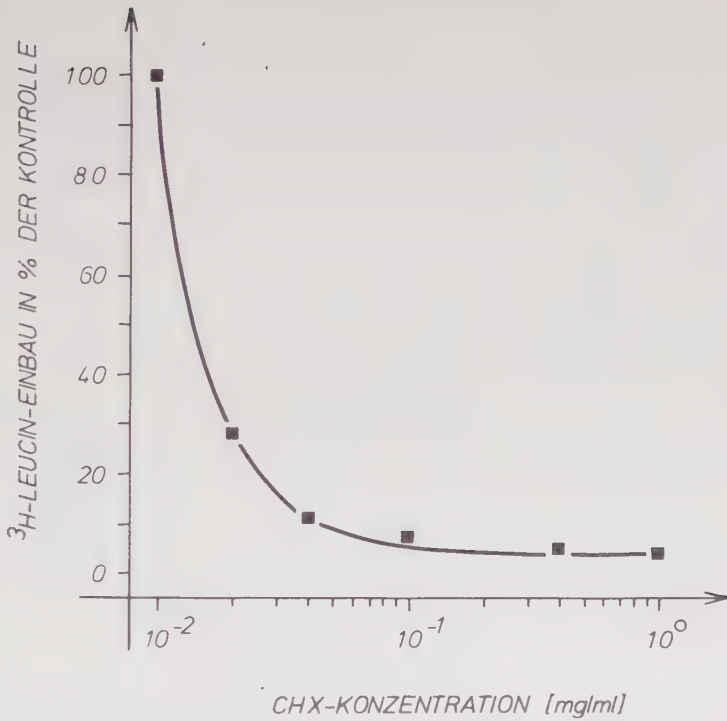


ABB (I 2)

In vivo Einbau von ^3H -Leucin in die Proteinfraction von Sch. pombe 972h⁻ in Abhängigkeit von der CHX Konzentration, angegeben in Prozent der nicht gehemmten Kontrolle. Die Markierungszeit betrug 15 Minuten, der Zelltitel $3,5 \times 10^8/\text{ml}$ und der 100 % Wert entspricht 5 800 Ipm/mg Protein.

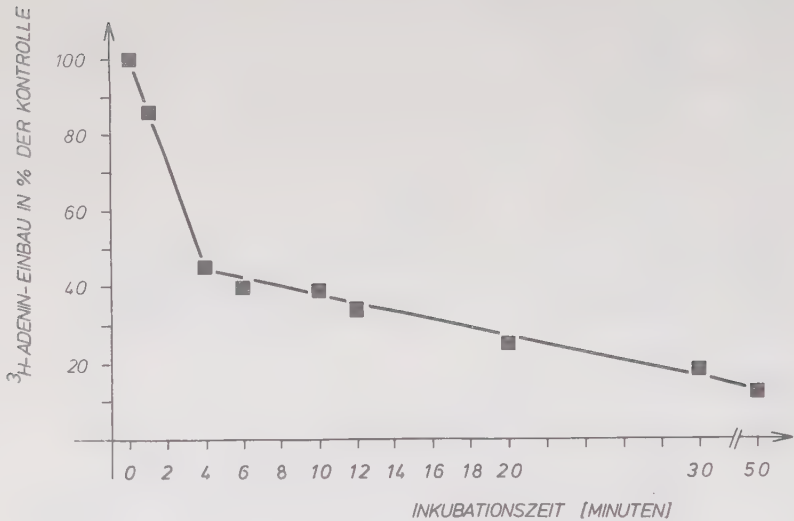


ABB.(I 3)

In vivo Einbau von ^3H -Adenin in die DNS-Fraktion von Sch. pombe 50h⁺ ade7⁻ in Gegenwart von CHX (0,2 mg/ml). CHX wurde 15 Minuten vor der ^3H -Markierung zugegeben. Der Einbau ist angegeben in Prozent der Kontrolle ohne Hemmstoff, wobei der 100 % Wert 4000 Ipm entspricht. Der Zelltitel betrug 5×10^8 /ml.

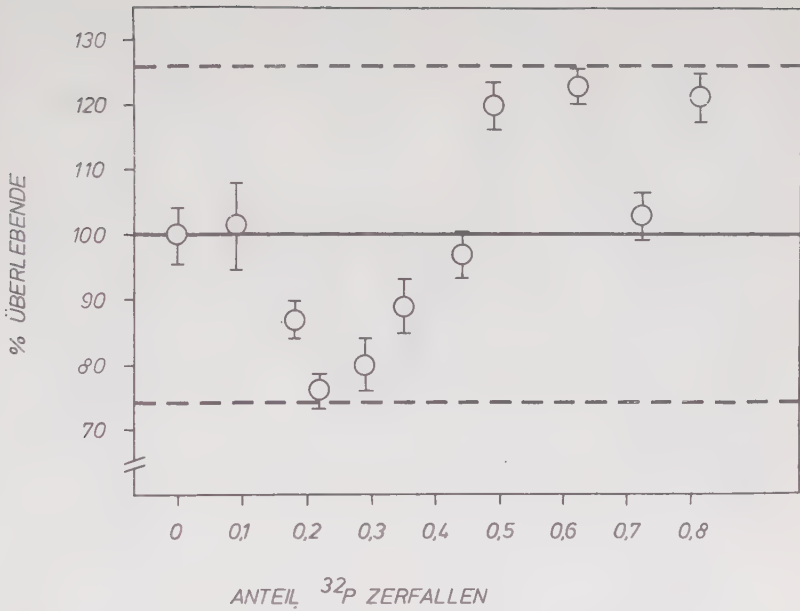


ABB. (III 1)

Prozentanteil der überlebenden Zellen in Abhängigkeit vom Zerfall des inkorporierten ^{32}P $\pm$ der statistischen Schwankung $2s$. 100 % entspricht $3,5 \times 10^7$ Zellen/ml. Pro Versuchspunkt wurden zwischen 1800 und 4000 Kolonien ausgezählt. Die gestrichelten Linien zeigen die aus der Kontroll-Versuchsreihe errechnete Standardabweichung (CAVALLI-SFORZA 1972) $\pm 2s$ ($s = 13,4 \%$), die sich durch das Arbeiten unter Strahlenschutzbedingungen ergibt.

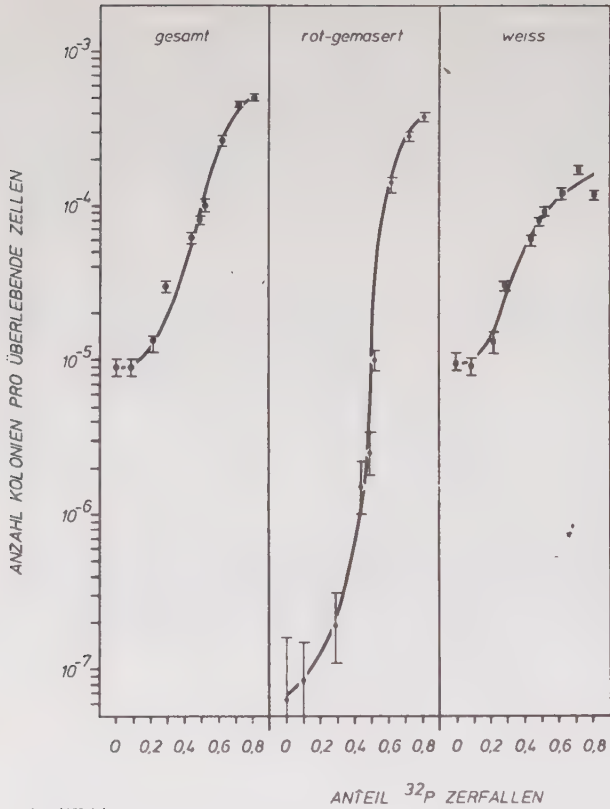


ABB (III 2)

Koloniehäufigkeit auf YEP-TTC-Medium (gesamt), Häufigkeit rot-gemaserter und weißer Kolonien auf YEP-TTC-Medium in Abhängigkeit zum Ausmaß des radioaktiven Zerfalls des in mitDNS inkorporierten $^{32}\text{P} \pm 2\text{s}$. Die experimentell ermittelten Daten sind in Tabelle (III 2) zusammengestellt.

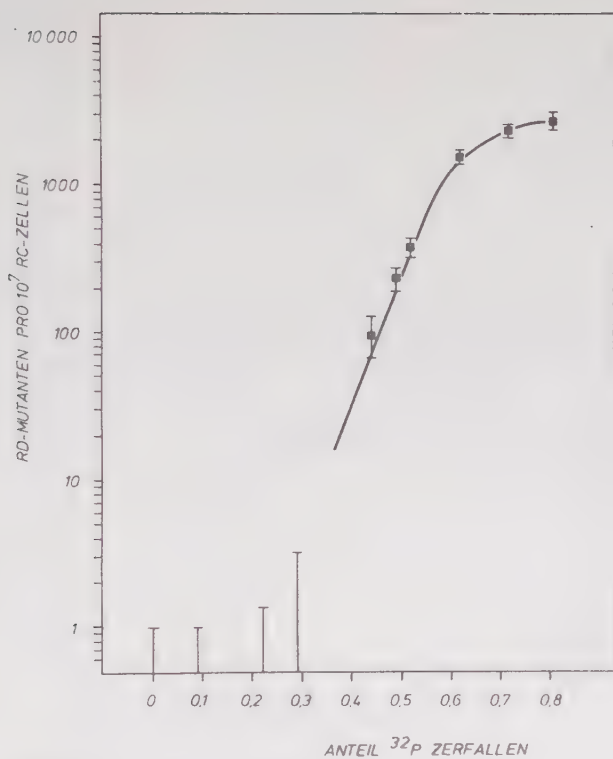


ABB (III 3)

Entstehungsrate der RD-Mutanten in Abhängigkeit vom radioaktiven Zerfall des inkorporierten ^{32}P , berechnet aus den Werten in Tabelle (III 2) und (III 3). Die Vertrauensgrenzen sind mit $p = 0,05$ eingetragen, für die Nullereignisse der Zerfallsintervalle 0 bis 0,29 ^{32}P zerfallen sind die oberen Grenzen mit $p = 0,01$ angegeben (KOLLER 1969).

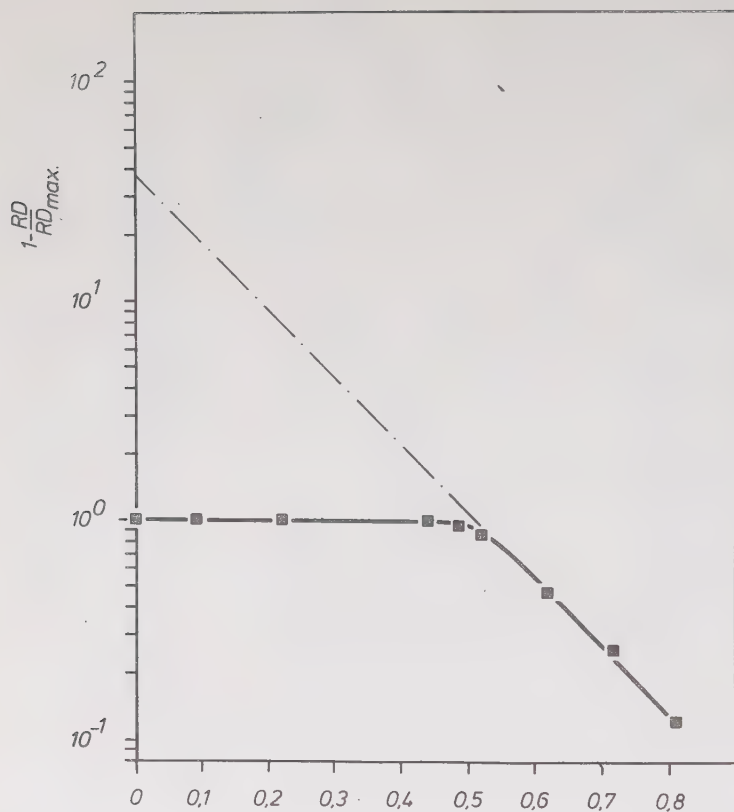


ABB. (III 4)

ANTEIL ^{32}P ZERFALLEN

Mutationskinetik der Entstehung atmungsdefekter Mutanten. Angegeben ist die relative Wirkung des ^{32}P -Zerfalls in Abhängigkeit vom Anteil der zerfallenen ^{32}P -Atome. Die Extrapolation des annähernd linearen Astes auf die Ordinate ergibt die Zahl der "empfindlichen Einheiten".

Inkubationszeit mit CHX in Stunden	Kolonien auf YEP-Glucose ausgezählt	vermehrungsfähige Zellen/ml $\times 10^8 \pm 2s$	
0	3786	1,15	0,04
6	2728	1,24	0,05

Tabelle (I 1)

Befähigung zur Koloniebildung nach Inkubation mit CHX und anschließendem Auswaschen des Hemmstoffes mit 0,2 M Acetatpuffer. Die CHX Konzentration betrug 0,2 mg/ml.

1	2	3	4	5	6
Gefrier- trock- nen	in 10 % Glycerin bei -20° C einge- froren	in flüssigem N_2 eingefroren aufbewahrt bei Temperatur $- 20^{\circ} C$ $- 80^{\circ} C$ $- 196^{\circ} C$			schrittweise eingefroren und aufbe- wahrt in flüssigem N_2
$3,5 \pm$ 1,6	$0,02 \pm$ 0,013	$0,15 \pm$ 0,06	$0,35 \pm$ 0,14	$0,92 \pm$ 0,46	$97,0 \pm 11,2$

Tabelle (II 1)

Koloniebildungs-Befähigung von Sch. pombe nach ver-
schiedenen Gefrierverfahren in Prozent der nicht be-
handelten Kontrollen. Die Aufenthaltsdauer betrug je-
weils 14 Tage, in der Spalte 6 bis zu 34 Tagen (siehe
auch Tabelle (III 5)).

Angegeben ist $\bar{x}$ aus 5 bis 7 Proben $\pm$ der Streuung 2s.

	Radioaktivität Ipm $\pm$ 2s	
Inkubations- gemisch	$2,8 \times 10^8$	0,62
1×10^9 Zellen	$2,7 \times 10^8$	0,54
Überstand und Waschflüssigkeit	$1,9 \times 10^6$	0,46

Tabelle (III 1)

Radioaktivität als Impulse pro Minute (Ipm) des Inkubationsgemisches, sowie aufgenommene Radioaktivität der Zellen nach Inkubation mit ^{32}P und Radioaktivität des Überstandes im Szintillationszähler PACKARD bestimmt. Angegeben ist $\bar{x}$ aus 3 - 5 Proben $\pm$ der Streuung 2s. Die Ausgangsaktivität betrug 1 mCi, das bedeutet eine spezifische Radioaktivität von 4 mCi/mg Phosphor.

Anzahl zer- fal- len	(a) vermehrungsfähige Zellen auf YEP-TTC plattiert $\times 10^7 \pm 2s$		(b) Anzahl Kolonien auf YEP-TTC gewachsen			(c) Koloniehäufigkeit auf YEP-TTC $\pm 2s$			
			gesamt	rot-ge- masert	weiß	gesamt $\times 10^{-5}$	rot-gemasert $\times 10^{-7}$	weiß $\times 10^{-5}$	
0,0	3,60	$\pm$ 0,17	323	2	321	0,9	0,63	0,99	$\pm$ 0,12
0,09	7,2	0,17	646	6	640	0,9	0,84	0,89	0,07
0,2	4,0	0,11	496	0	496	1,24	---	1,24	0,11
0,29	4,4	0,08	1304	8	1296	2,99	1,86	2,95	0,16
0,44	2,4	0,04	1482	36	1446	6,2	15,2	6,07	0,29
0,49	3,2	0,06	2564	80	2484	8,0	25,0	7,75	0,31
0,52	2,8	0,08	2860	274	2586	10,2	97,0	9,22	0,36
0,57	0,88	0,01	2346	1276	1070	26,6	1450	42,4	0,81
0,72	0,58	0,01	2560	1590	970	44,0	2720	16,8	1,04
0,81	0,66	0,01	3238	2484	754	49,0	3750	11,4	0,49

Tabelle (III 2)

Häufigkeiten mit denen Kolonien auf YEP-TTC-Medium auftreten in Abhängigkeit von verschiedenen langen Zerfallsintervallen des inkorporierten ^{32}P . Die Titer der auf YEP-TTC-Medium plattierten vermehrungsfähigen Zellen (a) wurden durch gleichzeitiges Plattieren auf YEP-Glucose-Medium ermittelt, wobei jeweils zwischen 2000 und 4000 Kolonien zur Auszählung kamen.

% ^{32}P zerfall- len	Kolonien von YEP-TTC auf YEP-Glycerin getestet			Anzahl RD-Mutanten gefunden			% RD-Mutanten an den Kolonien		
	gesamt	rot-ge- masert	weiß	gesamt	rot-ge- masert	weiß	gesamt	rot-ge- masert	weiß
0	406	6	400	0	-	-	0	-	-
9	400	0	400	0	-	-	0	-	-
22	396	8	388	0	-	-	0	-	-
29	400	28	372	0	-	-	0	-	-
44	240	36	204	36	30	6	15	83	2,95
49	280	80	200	78	76	2	27,9	95	1,0
52	341	120	221	126	109	17	37,0	91	7,7
62	400	252	148	238	220	18	59,5	87	12,2
72	496	242	254	260	206	54	52,4	85	21,3
81	348	176	208	220	150	70	63,2	85	33,8

Tabelle (III 3)

Häufigkeiten, mit denen RD-Mutanten innerhalb der von YEP-TTC-Medium isolierten Kolonien in Abhängigkeit vom radioaktiven Zerfall des in die mitDNS inkorporierten ^{32}P auftreten.

Anteil ^{32}P zerfallen	RD-Mutationsrate	
	rot-gemasert $\times 10^{-7}$	weiß $\times 10^{-5}$
0,0	0 +	0 +++
0,09	0 +	0 +++
0,22	0 +	0 +++
0,29	0 ++	0 +++
0,44	12,6	0,18
	9,3 14,4	0,005 0,46
0,49	23,9	0,08
	21,0 24,6	0,01 0,35
0,52	88,0	0,71
	79,9 93,0	0,35 1,24
0,62	1260	1,52
	1170 1340	0,77 2,56
0,72	2310	3,75
	2130 2450	2,54 4,82
0,81	3190	3,85
	2960 3490	2,92 4,90

Tabelle (III 4)

Mutationsrate zum RD-Typ der beiden Kolonietypen rot-gemasert und weiß (auf YEP-TTC-Medium) in Abhängigkeit vom radioaktiven Zerfall des in die mitDNS inkorporierten ^{32}P , berechnet aus den experimentell ermittelten Werten in Tabelle (III 2) und (III 3). Alle Vertrauensgrenzen sind mit $p = 0,01$ eingetragen. Die oberen Vertrauensgrenzen für die Nullereignisse der Intervalle von 0 - 0,29 ^{32}P zerfallen sind: + 0,03 $\times 10^{-7}$; ++ 0,28 $\times 10^{-7}$; +++ 0,01 $\times 10^{-5}$ (KOLLER 1969).

0	2150	8,96 ± 0,4	1,00	8,1	114	1,4 ± 0,26	114	0	Anzahl Tage im flüssigen Stickstoff	Anzahl Kolonien auf YEP-Glucose ausgezählt	teilungsfähige Zellen/ml x 10 ⁷ ± 2s	Anteil überlebender Zellen	Anzahl auf YEP-TTC getesteter teilungsfähiger Zellen x 10 ⁶	Anzahl auf YEP-TTC gefundener Kolonien	Anteil auf YEP-TTC zur Koloniebildung befähigter Zellen x 10 ⁻⁵ ± 2s	Anzahl auf YEP-Glycerin getesteter Kolonien	RD-Mutanten gefunden
2	2336	9,72 ± 0,39	1,10														
4	1963	8,20 ± 0,36															
7	1830	7,61 ± 0,35	0,85	9,8	101	1,0 ± 0,20	101	0									
12	2380	9,9 ± 0,39	1,06	8,4	98	1,2 ± 0,24	98	0									
20	2090	8,7 ± 0,38	0,97	32,0	348	1,1 ± 0,12	348	0									
26	2248	9,4 ± 0,38	1,05	34,0	316	0,9 ± 0,10	316	0									

Tabelle (III 5)

Koloniebildungsbefähigung der Zellen nach Aufenthalt in flüssigem Stickstoff sowie Einfluß der Verweildauer im flüssigen Stickstoff auf die RD-Mutationshäufigkeit und Fähigkeit der Zellen, auf YEP-TTC-Medium Kolonien bilden zu können.

10 ⁸ Zellen	Anzahl Ta- ge im fl. Stickstoff	Anteil ³² P zerfallen	Anzahl Ko- lonien auf YEP-Glucose ausgezählt	teilungs- fähige Zel- len/ml x 10 ⁷ ± 2s	Anteil über- lebender Zellen	Anzahl auf YEP-TTC ge- testeter teilungsfä- higer Zellen x 10 ⁷	Anzahl auf YEP-TTC ge- fundener Kolonien	Anteil auf YEP-TTC zur Koloniebil- dung befähig- ter Zellen x 10 ⁻⁵ ± 2s	Anzahl auf YEP-Glycerin getesteter Kolonien	RD-Mutanten gefunden
0,03	0 4 12 20 34	0,0 0,18 0,44 0,62 0,81	4563 2680 2766 2254 2637	3,34 ± 0,10 3,35 0,15 3,4 0,14 3,2 0,12 3,7 0,13	1,0 0,98 0,99 0,94 1,08	2,7 3,1 2,7 2,4 2,8	318 299 304 373 327	1,20 ± 0,13 0,96 0,11 1,1 0,13 1,5 0,16 1,2 0,13	318 299 304 300 300	0 0 0 0 0
0,30	7 12 14 26 34	0,29 0,44 0,49 0,72 0,81	4104 2780 2639 2679 3041	5,16 0,16 3,05 0,13 3,3 0,13 2,7 0,13 3,15 0,13	1,50 0,89 0,97 0,79 0,92	1,1 0,14 2,8 3,4 3,1	102 25 298 336 373	0,9 0,18 1,8 0,72 1,06 0,13 0,99 0,11 1,2 0,13	102 25 298 300 300	0 0 0 0 0

Tabelle (III 6)

Koloniebildungs-Befähigung der Zellen nach Einwirkung verschieden hoher Strahlendosen und Einfluss der radioaktiven Strahlung auf die RD-Mutationshäufigkeit und Fähigkeit der Zellen, auf YEP-TTC-Medium Kolonien zu bilden. Die eingesetzte radioaktive Dosis entspricht der einfachen bzw. der zehnfachen Dosis des Einbauversuches.

	Inkubationszeit (Stunden)	
	0	5
Anzahl Kolonien auf YEP-Glucose ausgezählt	2150	812
teilungsfähige Zellen pro ml x $10^7 \pm 2s$	$8,96 \pm 0,41$	$9,75 \pm 0,7$
Anzahl auf YEP-TTC getesteter teilungsfähiger Zellen x 10^6	8,1	6,8
Anzahl auf YEP-TTC gefundener Kolonien	114	84
Anteil auf YEP-TTC zur Koloniebildung befähigter Zellen x $10^{-5} \pm 2s$	$1,4 \pm 0,26$	$1,24 \pm 0,27$
Anzahl auf YEP-Glycerin getesteter Kolonien	114	84
Anzahl RD-Mutanten gefunden	0	0

Tabelle (III 7)

Kontrolle der Toxizität und Mutagenität der Lösung, in welcher ^{32}P verwendet wird. Die Radioaktivität war über 11 Monate abgeklungen. Die Zellen wurden 0 bzw. 5 Stunden mit dieser Lösung bei $30^{\circ}C$ inkubiert.

Anzahl Generationen	zur Koloniebildung befähigte Zellen/ml	RC-Zellen gefunden
0	$5,8 \times 10^2$	0 unter $7,0 \times 10^3$
	$8,4 \times 10^4$	0 " $5,3 \times 10^5$
	$2,3 \times 10^6$	0 " $1,5 \times 10^6$
14,6	$1,3 \times 10^7$	0 " $8,2 \times 10^5$
Verdünnung 1 : 500		
	$2,6 \times 10^4$	0 " $2,4 \times 10^5$
	$3,8 \times 10^6$	0 " $2,4 \times 10^6$
23,2	$1,0 \times 10^7$	0 " $3,2 \times 10^6$
Verdünnung 1 : 500		
	$2,0 \times 10^4$	0 " $2,4 \times 10^5$
	$8,9 \times 10^5$	0 " $2,8 \times 10^6$
32,7	$1,4 \times 10^7$	0 " $4,4 \times 10^6$
Verdünnung 1 : 500	$2,8 \times 10^4$	0 " $2,9 \times 10^5$
	$4,5 \times 10^6$	0 " $1,4 \times 10^6$
41,9	$1,7 \times 10^7$	0 " $1,1 \times 10^6$
Verdünnung 1 : 1000		
	$1,7 \times 10^4$	0 " $1,9 \times 10^5$
	$3,1 \times 10^6$	0 " $2,0 \times 10^6$
52,0	$1,8 \times 10^7$	0 " $2,5 \times 10^6$
Verdünnung 1 : 500		
	$3,6 \times 10^4$	0 " $1,8 \times 10^5$
	$8,9 \times 10^5$	0 " $2,8 \times 10^6$
	$9,3 \times 10^6$	0 " $2,9 \times 10^6$
62,0	$1,9 \times 10^7$	0 " $3,0 \times 10^6$
Verdünnung 1 : 1000		
	$1,9 \times 10^4$	0 " $2,0 \times 10^5$
	$3,6 \times 10^6$	0 " $2,3 \times 10^6$
71,6	$1,4 \times 10^7$	0 " $3,0 \times 10^6$
Verdünnung 1 : 500		
	$2,8 \times 10^4$	0 " $3,5 \times 10^5$
	$7,9 \times 10^6$	0 " $2,5 \times 10^6$
80,5	$1,3 \times 10^7$	0 " $2,7 \times 10^6$

Tabelle (IV 1)

Zellvermehrung einzelner RD-Mutanten in kontinuierlicher YEP-Glucose-Kultur bei 30° C. Durch Plattieren auf YEP-Glucose- bzw. auf YEP-Glycerin-Medium wurde die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen und der RC-Zellen ermittelt. Pro Titerwert kamen zwischen 2000 und 3500 Kolonien zur Auszählung.

Inku- bations- zeit (Stunden)	Kolonien auf YEP-Glucose ausgezählt	zur Koloniebildung befähigte Zellen/ml auf YEP-Glucose auf YEP-Glycerin gefunden	
0	2631	$9,0 \times 10^4$	0 unter $5,1 \times 10^5$
12	2130	$1,6 \times 10^6$	0 " $1,3 \times 10^6$
24	1742	$9,5 \times 10^6$	0 " $2,3 \times 10^6$
30	1568	$2,2 \times 10^7$	0 " $3,1 \times 10^6$
36	2055	$2,4 \times 10^7$	$6,3 \times 10^5$
42	1098	$2,5 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$
48	1238	$2,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
54	1886	$2,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$
60	2058	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$

Tabelle (IV 2)

Befähigung zur Koloniebildung der RD-Mutante RD-36
auf YEP-Glucose und auf YEP-Glycerin in Abhängigkeit
von der Zellvermehrung in YEP-Glucose-Medium.

Glucose- konzentration (Gew.-%)	Kolonien auf YEP-Glucose ausgezählt	zur Koloniebildung befähigte Zellen/ml	
		auf YEP-Glucose gefunden	auf YEP-Glycerin
2	2748	$8,0 \times 10^4$	0 unter $4,3 \times 10^5$
2	2806	$5,3 \times 10^6$	0 " $2,8 \times 10^6$
2	2885	$2,7 \times 10^7$	0 " $1,4 \times 10^6$
2	1934	$3,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$
2	2397	$6,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
2	2371	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
2	2022	$1,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$

Tabelle (IV 3)

Zellvermehrung von RD-Mutanten in YEP-Glucose-Medium mit konstanter Glucosekonzentration. Die Koloniebildungsbefähigung und die Fähigkeit zu atmen wurde durch Plattieren der Zellen auf YEP-Glucose bzw. YEP-Glycerin bestimmt.

Glucose- konzentration (Gew.-%)	zur Koloniebildung befähigte Zellen/ml auf YEP-Glucose auf YEP-Glycerin gefunden	
2	$3,8 \times 10^5$	0 unter $2,0 \times 10^6$
0,5	$4,3 \times 10^6$	0 " $2,3 \times 10^6$
0,5	$9,2 \times 10^6$	0 " $4,9 \times 10^6$
Verdünnung 1 : 2 mit YEP-Medium <u>ohne</u> Glucose		
0,25	$4,6 \times 10^6$	0 unter $2,4 \times 10^6$
0,1	$8,7 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$
Verdünnung 1 : 2 mit YEP-Medium <u>ohne</u> Glucose		
0,05	$4,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$
0,0	$5,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$

Tabelle (IV 4)

Zellvermehrung einzelner RD-Mutanten in kontinuierlicher YEP-Glucose-Kultur mit abnehmender Glucosekonzentration. Die Kulturen wurden jeweils 1 : 2 mit frischem YEP-Medium ohne Glucose verdünnt. Die Koloniebildungspotenz sowie die Fähigkeit zu atmen wurde durch Plattieren auf YEP-Glucose- bzw. YEP-Glycerin-Medium bestimmt. Dafür kamen jeweils etwa 2 500 Kolonien auf YEP-Glucose zur Auszählung.

Reihe	Gesamtzellzahl		T1		TRC		lgT1/lgTS
	$\times 10^7 \pm 2s$	vermehrungs- fähige Zellen $\pm 2s$ pro ml $\times 10^7$	Gesamtzell- zahl pro ml $\times 10^7 \pm 2s$	vermehrungs- fähige Zellen $\pm 2s$ pro ml $\times 10^7$	Anzahl Kolonien auf YEP-Glycerin ausgezählt	Anzahl RC-Zellen pro ml $\times 10^7 \pm 2s$	
1	5,4 $\pm$ 0,20	5,4 $\pm$ 0,20	1,3 $\pm$ 0,14	1,4 $\pm$ 0,06	1372	0,025 $\pm$ 0,002	0,923
2	14,0	14,0	2,1	1,9	992	0,18	0,899
3	4,1 0,82	3,4 0,15	3,2 0,40	2,2 0,09	1148	0,21 0,01	0,973
4	8,3 1,02	7,2 0,26	3,3 0,50	4,5 0,16	1598	0,61 0,03	0,974
5	4,9 0,93	4,4 0,19	0,8 0,37	1,9 0,07	1766	0,32 0,02	0,957
6	3,8 0,77	5,1 0,21	4,0 0,38	3,1 0,12	1275	0,99 0,05	0,974
7	4,4 0,64	4,0 0,17	1,5 0,40	1,7 0,08	1148	0,52 0,05	0,951
8	8,4 1,01	7,5 0,28	5,6 0,48	4,6 0,16	1196	1,6 0,05	0,976
9	10,4 1,92	9,2 0,34	1,9 0,35	2,7 0,11	1210	1,4 0,04	0,934
10	8,5 1,00	7,6 0,29	3,5 0,39	2,8 0,12	1343	1,8 0,05	0,945
11	7,8 0,99	6,7 0,26	4,2 0,49	3,5 0,14	1335	3,1 0,08	0,962
12	5,1 0,64	4,2 0,18	1,2 0,27	1,4 0,06	1048	1,2 0,04	0,936
13	5,2 0,97	5,2 0,21	2,0 0,39	2,6 0,09	1857	2,5 0,06	0,961

Tabelle (IV 5)

Die Tabelle zeigt den Titer der stationären Phase: TS; Titer der Kultur, bei dem erstmals unter $1 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml YEP-Glycerin untersuchten Zellen RC-Zellen auftraten: T1; und der dabei ermittelte Titer der RC-Zellen: TRC; sowie das Verhältnis der Logarithmen der Titer T1 und TS, welches ein Maß für den Reichtum an RC-Zellen darstellt, in dem erstmals RC-Zellen auftraten. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden jeweils zwischen 75 und 320 Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Ermittlung der Anzahl vermehrungsfähiger Zellen/ml erfolgte durch Auszählen von jeweils 2000 bis 3000 Kolonien auf YEP-Glucose.

Kreuzung	Anzahl Kolonien auf Minimalmedium plus Adenin	Anzahl Kolonien auf Leucin oder Histitin	Anzahl Kolonien auf YEP-Glycerin	Verhältnis RC : RD 4 : 0 bzw. 2 : 2
Nr.				
1	816	334	1150	"
2	430	569	999	"
3	1234	1027	2261	"
4	1078	917	1995	"
5	500	515	1015	"
6	806	1115	1921	"
7	1112	942	2054	"
8	566	477	1043	"
9	595	589	569	"
10	778	1300	2078	"
11	761	1278	2039	"
12	720	560	1280	"
13	363	178	253	"
14	187	130	266	"
15	163	124	287	"
16	254	234	488	"
17	210	157	367	"
18	173	211	348	"
19	252	158	221	"
20	112	103	215	"
21	384	167	551	"
22	123	164	287	"
23	133	162	160	"
24	98	112	210	"
25	352	182	241	"
26	253	328	589	"
27	185	189	374	"
28	107	130	237	"
29	95	106	201	"
30	160	154	314	"
31	179	220	399	"
32	230	180	410	"
33	134	152	286	"
34	205	316	521	"
35	211	321	532	"
36	304	346	650	"
37	255	289	544	"
38	241	315	556	"
39	225	282	507	"
40	286	410	696	"
41	212	240	452	"
42	355	306	661	"
43	213	206	419	"
44	172	105	277	"
45	281	230	511	"
46	263	300	563	"
47	238	269	507	"

Tabelle (IV 6)

Kreuzung Nr.	Anzahl Kolonien auf Minimalmedium plus Adenin	Anzahl Kolonien auf Leucin oder Histitin	Anzahl Kolonien auf YEP-Glycerin	Verhältnis RC : RD 4 : 0 bzw. 2 : 2
48	196	157	353	"
49	169	243	412	"
50	132	148	280	"
51	376	370	746	"
52	395	469	864	"
53	240	234	474	"
54	420	249	348	"
55	450	230	680	"
56	185	166	351	"
57	265	369	634	"
58	355	405	760	"
59	202	231	433	"
60	183	206	389	"
61	151	121	272	"
62	75	94	169	"
63	130	187	317	"
64	101	114	215	"
65	290	286	576	"
66	186	219	214	"
67	112	109	221	"
68	276	327	513	"
69	154	90	244	"
70	265	209	474	"
71	350	283	633	"
72	183	113	314	"
73	101	157	258	"
74	107	146	253	"
75	380	293	673	"
76	263	270	533	"
77	102	142	244	"
78	88	79	167	"
79	384	177	561	"
80	342	191	533	"
81	240	393	633	"
82	139	265	404	"
83	180	202	382	"
84	304	294	598	"
85	340	418	758	"
86	436	294	730	"
87	254	289	543	"
88	192	298	490	"
89	203	287	490	"
90	265	271	536	"
91	720	560	622	"
92	230	220	450	"
93	194	270	464	"

Tabelle (IV 6)

Kreuzung	Anzahl Kolonien auf Minimalmedium plus Adenin	Anzahl Kolonien auf YEP-Glycerin plus Leucin oder Histidin	Verhältnis RC : RD
			4 : 0 bzw. 2 : 2
Nr.			
94	167	150	118
95	730	324	558
96	650	365	1015
97	481	182	663
98	251	234	485
99	296	262	558
100	251	198	449
101	158	126	248
102	620	301	921
103	318	123	214
104	269	230	499
105	276	213	489
106	431	398	829
107	355	268	623
108	311	269	590
109	428	269	697
110	190	275	365
111	590	350	940
112	192	297	489
113	225	275	500
114	378	143	521
115	167	190	357
116	599	311	910
117	379	280	659
118	497	483	980
119	189	162	351
120	481	444	925
121	576	223	799

Tabelle (IV 6)

Kreuzungen mit nachfolgender Freisporanalyse der RD-Mutanten der Stämme 623h⁺ ade6 und 50h⁻ ade7 mit den RC-Partnern 32h⁻ leu1 bzw. 88h⁺ his2.

Angegeben ist die Zahl der gewachsenen Sporenkolonien auf Minimalmedium mit entsprechender Supplementierung und die Zahl der Sporenkolonien auf YEP-Glycerin jeweils nach Übertragung von YEP-Glucose-Mutterplatten mit Hilfe eines Samtstempels.

RD-Mutanten Nr.	Aufspaltung RC : RD	Anzahl untersuchter Tetraden
3	4 : 0	1
15	4 : 0	1
32	4 : 0	2
48	4 : 0	1
49	4 : 0	3
67	4 : 0	2
72	4 : 0	1

Kreuzung der RD-Mutanten 50h⁻ ade7 mit dem RC-Stamm 88h⁺ his2

32	4 : 0	2
37	4 : 0	2
40	4 : 0	1
54	4 : 0	2
81	4 : 0	2

Kreuzung der RD-Mutanten 623h⁺ ade6 mit dem RC-Stamm 32h⁻ leu1

Tabelle (IV 7)

RD-Mutanten der auxotrophen Stämme 50h⁻ ade7 und 623h⁺ ade6 wurden mit den angegebenen Partnern gekreuzt und die Meioseprodukte einzeln mit Hilfe der Tetradenanalyse auf ihre Fähigkeit zu atmen untersucht.

Kreuzung	Anzahl Kolonien auf Minimalmedium plus:		Anzahl Kolonien auf YEP-Glycerin	Verhältnis	
Nr.	Adenin	Histidin		RC	RD
				4:0	2:2
122	12	9	21	"	
123	5	3	8	"	
124	4	2	6	"	
125	9	5	14	"	
126	7	5	12	"	
127	6	4	10	"	
128	1	3	4	"	
129	8	6	14	"	
130	5	3	8	"	
131	4	3	7	"	
132	11	8	19	"	
133	8	6	14	"	

Tabelle (IV 8)

Ergebnisse der Freisporanalyse der Kreuzungen der RD-Mutanten des Stammes 50h⁻ ade7 mit dem RC-Partner 88h⁺ his2. Der experimentelle Ansatz entspricht bis auf die Wahl des Kreuzungsmediums den Angaben in Tabelle (IV 6). Die Kreuzungen Nr. 122 - 133 wurden auf einem stickstoffarmen synthetischen Medium (LEU-POLD 1955) angesetzt.

RD-Mutanten Nr.	Aufspaltung RC : RD	Anzahl untersuchter Tetraden
122	3 : 0	2 ⁺)
123	3 : 0	1 ⁺)
124	3 : 0	1 ⁺)
125	4 : 0	2

Tabelle (IV 9)

Tetradenanalyse von Kreuzungen der RD-Mutanten des auxotrophen Stammes 50h⁻ ade7 mit dem atmungskompetenten Stamm 88h⁺ his2.

Als Kreuzungsmedium wurde das stickstoffarme synthetische Medium nach LEUPOLD (1955) verwendet.

⁺) Bei diesen Tetraden keimten jeweils nur drei Sporen aus.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name: Annelies Ingrid Furtmayr-Schuh
Geburtsdatum: 27. 5. 1940
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Anton Schuh, Diplomchemiker (gefallen)
und Thusnelde Lohse, verw. Schuh,
geb. Weiss.

Schulbildung und Studium:

1946 - 1954 Besuch der Grundschule und
1954 - 1958 der Oberschule mit Abitur in
Mittweida (DDR)
bis 1959 Absolvierung des obligatorischen
praktischen Jahres
1959 - 1960 Zahnmedizinstudium an der Humboldt-
Universität Berlin
1960 - 1961 Studium an der Pädagogischen
Akademie Bonn
1962 - 1963 Abituranerkennungskurs für Studenten
und Abiturienten aus der DDR
1964 Beginn des Studiums der Naturwissen-
schaften mit dem Hauptfach Mikrobi-
ologie an der damaligen TH-München
1967 - 1968 Studium an der University of Hull
in England bei Prof. Dr. E. Dawes
mit abschließendem B. Sc. Degree
of Biochemistry
1970 Diplomprüfung in Biologie an der
TU-München, Übernahme einer
Diplomarbeit und
1971 einer Dissertation bei Prof. Dr.
F. Kaudewitz am Genetischen Institut
der Universität München

Berufliche Tätigkeit:

1971 - 1973 Verwalterin der Dienstgeschäfte eines
wissenschaftlichen Assistenten am Gene-
tischen Institut der Universität München.

